

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica



**“EVALUACIÓN DEL EFECTO HIPOGLUCEMIANTE DEL EXTRACTO
DE HOJAS DE *Moringa oleífera* Lam. “Moringa” EN HIPERGLUCEMIA
INDUCIDA EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN. AREQUIPA-2018”**

Tesis presentada por las Bachilleres:
Camargo Anahua, Cristel Patricia
Choque Llerena, Idania Estephany
para optar el Título Profesional de
Química Farmacéutica

Asesor:
Q.F. Torres Vela, Fernando

AREQUIPA - PERÚ
2018

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

Expediente N°. 20180000017332

Nº Trámite en Fac. 1743-2018

Fecha 05-04-2018

FORMATO DE TITULACION PROFESIONAL

DE: CAMARGO ANAHUA, Cristel Patricia
CHOQUE LLERENA, Idania Estephany

TITULO DEL PROYECTO DE TESIS:

"EVALUACION DEL EFECTO HIPOLIPEMIANTE E HIPOGLUCEMIANTE DEL EXTRACTO ETANOLICO DE Moringa oleifera "MARANGO" EN ANIMALES DE EXPERIMENTACION. AREQUIPA - 2018"

DICTAMINADORES: 1) Mgter. Maria Elena Guillén Núñez 2) Mgter. Julitza Paredes Fuentes

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, como Dictaminadores del Plan de Tesis presentado por las recurrentes, se ha procedido a la revisión del mismo, sugiriendo se cambie el título a: "EVALUACION DEL EFECTO HIPOGLUCEMIANTE DEL EXTRACTO DE Moringa oleifera "MARANGO" EN ANIMALES DE EXPERIMENTACION. AREQUIPA-2018", y después de realizadas las correcciones y sugerencias correspondientes, consideramos se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad

Atentamente

Firmas:

(Devolver antes de 8 días hábiles)

Fecha 18/04/2018

ASESOR: Q. F. Fernando Torres Vela

DICTAMEN DE ASESOR: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación se ha asesorado el presente Trabajo de Investigación y después de efectuadas las observaciones, considero que el título debe cambiar a: "EVALUACION DEL EFECTO HIPOGLUCEMIANTE DEL EXTRACTO DE HOJAS DE Moringa oleifera Lam. "MORINGA" EN HIPERGLUCEMIA INDUCIDA EN ANIMALES DE EXPERIMENTACION. AREQUIPA-2018" y luego de verificado el cumplimiento de los objetivos y la redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes considero se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad.

Firma

Fecha 04-04-2018

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) Dr. José Villanueva Salas
- 2) Mgter. Maria Elena Guillén Núñez
- 3) Mgter. Julitza Paredes Fuentes

DICTAMEN DE BORRADOR:

Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, hemos procedido a revisar el Borrador de Tesis presentado por los recurrentes, y luego de haber verificado el cumplimiento de los objetivos, la redacción del informe, de los resultados, discusión y conclusiones correspondientes, consideramos se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente

Firma

(Devolver antes de 15 días hábiles)


Fecha 09/10/18

JURADOS: Presidente Dr. José Villanueva Salas
Vocal Mgter. Maria Elena Guillén
Secretario Mgter. Julitza Paredes Fuentes

SUSTENTACIÓN DE TRABAJO:

Fecha: 25/10/18 Hora: 19:30 Local: C-402 (SUM)

DECANO



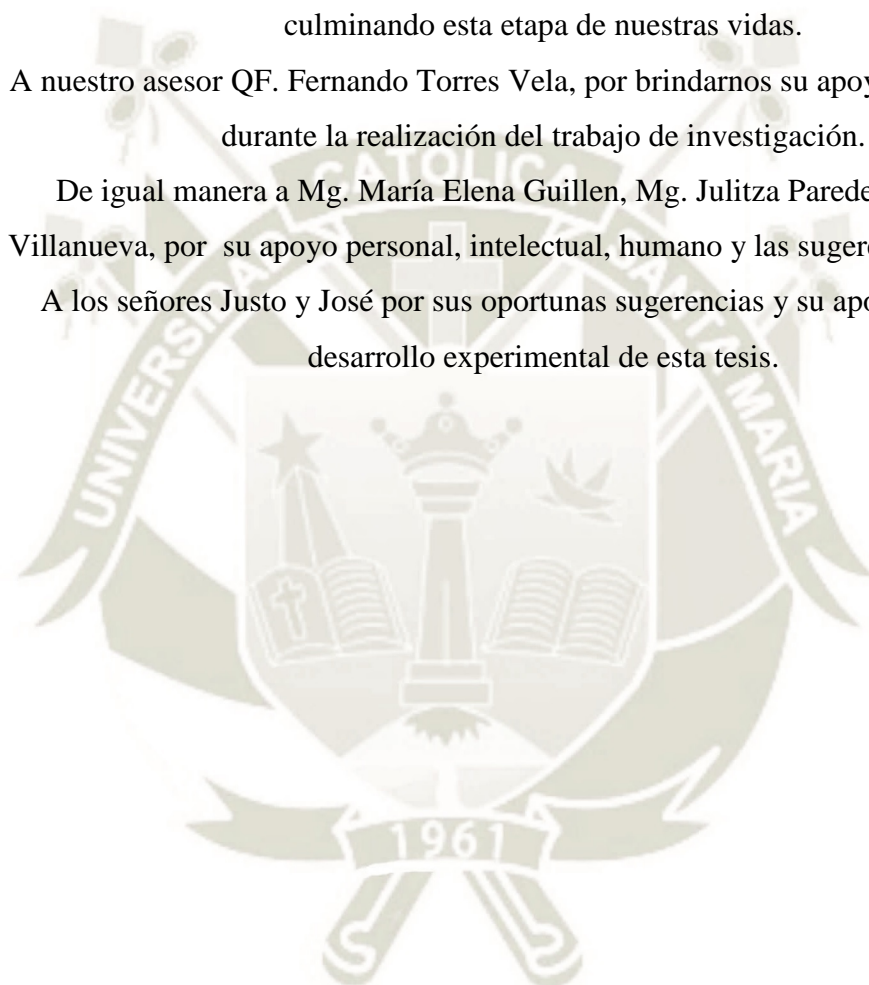
AGRADECIMIENTOS

A nuestros padres, pilares de nuestra vida que han dado toda su compañía, esfuerzo, perseverancia, confianza, amor y fortaleza para que nosotras ahora estemos culminando esta etapa de nuestras vidas.

A nuestro asesor QF. Fernando Torres Vela, por brindarnos su apoyo incondicional durante la realización del trabajo de investigación.

De igual manera a Mg. María Elena Guillen, Mg. Julitza Paredes, PhD. José Villanueva, por su apoyo personal, intelectual, humano y las sugerencias recibidas.

A los señores Justo y José por sus oportunas sugerencias y su apoyo durante el desarrollo experimental de esta tesis.





RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo por objetivo la evaluación del efecto hipoglucemiante del extracto de hojas de *Moringa oleífera* Lam “Moringa”, en un modelo de hiperglucemia experimental producida por Estreptozotocina (STZ) en ratas Wistar, llevado a cabo en las instalaciones de la Universidad Católica de Santa María, en los laboratorios de Farmacognosia, Farmacotecnia y Bioterio, en el periodo de Marzo-Agosto 2018.

Se realizó un análisis de los grupos de metabolitos secundarios presentes en el extracto de hojas con diferentes solventes: etanol 96°, acetato de etilo y éter etílico, evidenciándose la presencia de flavonoides, taninos, alcaloides y saponinas. Además se evaluaron los rendimientos, teniendo como mejor resultado el extracto etanólico de hojas de *Moringa oleífera* Lam “Moringa”.

Se procedió a la inducción de hiperglucemia experimental con STZ (45 mg/Kg), utilizando 25 ratas, distribuidos en 5 grupos de experimentación: **Grupo BLANCO:** Animales aparentemente sanos; **Grupo STZ:** inducidos a hiperglucemia experimental por STZ y un placebo (agua destilada); **Grupo METFORMINA:** inducido a hiperglucemia experimental por STZ y tratado con metformina a una dosis de 350 mg/Kg y **Grupo EXTRACTO:** dos grupos inducidos a hiperglucemia experimental por STZ tratado con el extracto etanólico de hojas de *Moringa oleífera Lam* (EEtMO) a dosis de 350 y 500 mg/Kg.

Las mediciones de los niveles de glucosa en sangre fueron: glucosa basal, glucosa post-STZ (día 0), y empezado el tratamiento los días 5 ,10 ,15 ,20 ,25 y 30, adicionalmente se evaluaron los pesos en este tiempo.

El experimento se ajusta a un diseño completamente al azar (DCR) y los datos se analizaron mediante el ANOVA y el Test de TUKEY.

Los resultados expresaron que el EEtMO demostró un efecto hipoglucemiante, ya que a los 30 días respecto al EEtMO 500 mg/Kg se alcanzó un promedio en los niveles de glucosa de 99.6 ± 5.41 mg/dL con un porcentaje de disminución de 76.14%; respecto al EEtMO a una dosis de 350 mg/Kg el promedio en los niveles de glucosa alcanzados fueron 120.2 ± 6.49 mg/dL con un porcentaje de disminución de 72.22%, con el tratamiento Metformina a una dosis 350 mg/Kg el promedio en niveles de glucosa alcanzado fue de 68 ± 8.66 mg/dL presentando un porcentaje de disminución de 82.61%.

El análisis histopatológico de páncreas e hígado reveló que administrado el EEtMO en dosis de 500 y 350 mg/Kg mostraron una rejuvenecimiento y protección en las células de los islotes pancreáticos, además de la conservación de la arquitectura histológica.

Palabras clave: Moringa, glucosa, estreptozotocina, hipoglucemiante.



ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the hypoglycemic effect of leaf extract of *Moringa oleifera* Lam "Moringa", in a model of experimental hyperglycemia produced by Streptozotocin (STZ) in Wistar rats, carried out in the facilities of the University Católica de Santa María, in the laboratories of Pharmacognosy, Farmacotecnia and Bioterio, in the period of March-August 2018.

An analysis was made of the groups of secondary metabolites present in the leaf extract with different solvents: 96 ° ethanol, ethyl acetate and ethyl ether, demonstrating the presence of flavonoids, tannins, alkaloids and saponins. In addition, the extracts were evaluated, with the best result being the ethanol extract of *Moringa oleifera* Lam "Moringa" leaves.

We proceeded to the induction of experimental hyperglycemia with STZ (45 mg/Kg), using 25 rats, distributed in 5 experimental groups: **WHITE Group**: Apparently healthy animals; **STZ group**: induced to experimental hyperglycemia by STZ and a placebo (distilled water); **METFORMIN group**: induced to experimental hyperglycemia by STZ and treated with metformin at a dose of 350 mg/Kg and **EXTRACT Group**: two groups induced to experimental hyperglycemia by STZ treated with the ethanol extract of *Moringa oleifera* Lam leaves (EEtMO) at a dose of 350 and 500 mg/Kg.

The measurements of the blood glucose levels were: basal glucose, post-STZ glucose (day 0), and after treatment was started, on days 5, 10, 15, 20, 25 and 30, additionally the weights were evaluated during the course of the treatment.

The experiment is adjusted to a completely randomized design (DCR) and the data were analyzed by the ANOVA and the TUKEY test.

The results expressed that the EEtMO showed a hypoglycemic effect, since after 30 days with respect to the EEtMO 500 mg / Kg an average was reached in the glucose levels of 99.6 ± 5.41 mg / dL with a percentage of decrease of 76.14%; Regarding the EEtMO at a dose of 350 mg / Kg the average glucose levels reached were 120.2 ± 6.49 mg / dL with a percentage decrease of 72.22%, with the Metformin treatment at a dose 350 mg / Kg the average in glucose levels reached was 68 ± 8.66 mg / dL, showing a percentage decrease of 82.61%.

The histopathological analysis of pancreas and liver revealed that administered the EEtMO in doses of 500 and 350 mg / Kg showed a rejuvenation and protection in the pancreatic islet cells, in addition to the preservation of the histological architecture.

Key words: Moringa, glucose, streptozotocin, hypoglycemic.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	iii
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	vi
ABREVIATURAS.....	xv
INTRODUCCIÓN.....	xvi
HIPÓTESIS.....	xvii
OBJETIVOS.....	xviii
CAPÍTULO I.....	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1. <i>Moringa oleífera</i> Lam (MORINGA).....	1
1.1. CLASIFICACIÓN DE LA ESPECIE.....	2
1.2. COMPOSICIÓN QUÍMICA.....	2
1.3. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS.....	3
2. PÁNCREAS.....	4
2.1. PÁNCREAS EXOCRINO.....	5
2.2. PÁNCREAS ENDOCRINO.....	5
2.2.1. HISTOLOGÍA DEL PÁNCREAS ENDOCRINO.....	5
2.2.1.1. CÉLULAS BETA (β).....	6
2.2.1.2. CÉLULAS ALFA (α).....	8
2.2.1.3. CÉLULAS DELTA (δ).....	10
3. GLUCEMIA.....	10
4. HIPERGLUCEMIA.....	11
5. DIABETES <i>MELLITUS</i>	11
5.1. CLASIFICACIÓN DE LA DIABETES <i>MELLITUS</i>	12
5.1.1. DIABETES <i>MELLITUS</i> TIPO 1.....	12
5.1.2. DIABETES <i>MELLITUS</i> TIPO 2.....	13
5.1.3. DIABETES GESTACIONAL.....	13
5.1.4. OTROS TIPOS ESPECÍFICOS DE DIABETES <i>MELLITUS</i>	14
5.2. SÍNTOMAS DE LA DIABETES.....	14
5.3. DIAGNÓSTICO DE LA DIABETES.....	15
5.3.1. PRUEBA DE TOLERANCIA ORAL A LA GLUCOSA.....	15

5.4. COMPLICACIONES DE LA DIABETES.....	15
5.4.1. COMPLICACIONES AGUDAS.....	15
5.4.2. COMPLICACIONES CRÓNICAS.....	16
6. TRATAMIENTO DE LA DIABETES.....	17
6.1. TRATAMIENTO NO FARMACOLÓGICO DE LA DIABETES.....	17
6.2. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DE LA DIABETES.....	18
6.2.1. SULFONILUREAS.....	18
6.2.2. BIGUANIDAS.....	19
6.2.3. TIAZOLIDINEDIONAS.....	20
6.2.4. INHIBIDORES DE DE α -GLUCOSIDASA	20
6.2.5. INSULINOTERAPIA.....	20
7. HIPERGLUCEMIA EXPERIMENTAL.....	21
7.1. ESTREPTOZOTOCINA.....	21
7.1.1. MECANISMO DE ACCIÓN.....	22
CAPÍTULO II.....	23
MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
1. LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN.....	23
2. MATERIALES.....	23
2.1. MATERIAL VEGETAL.....	23
2.2. MATERIAL BIOLÓGICO.....	23
2.3. EQUIPOS DE LABORATORIO.....	23
2.4. MATERIALES DE LABORATORIO.....	23
2.5. MATERIAL ANEXO.....	24
2.6. TRATAMIENTOS Y FÁRMACOS.....	24
2.7. REACTIVOS DE LABORATRIO.....	25
3. MÉTODOS.....	25
3.1. TRATAMIENTO DE LA UNIDAD VEGETAL.....	25
3.1.1. SELECCIÓN Y RECOLECCIÓN.....	25
3.1.2. PREPARACIÓN DE <i>Moringa oleífera</i> Lam “MORINGA”.....	27
3.2. MÉTODO DE OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE <i>Moringa oleífera</i> <i>Lam</i> CON DIFERENTES SOLVENTES.....	28

3.2.1. MÉTODO DE EXTRACCIÓN CONTINUA: EQUIPO DE SOXHLET.....	28
3.3. RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS.....	31
3.3.1. MÉTODO GRAVIMÉTRICO.....	31
3.4. ANÁLISIS FITOQUÍMICO.....	32
3.4.1. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.....	32
3.4.2. MÉTODO CROMATOGRÁFICO.....	34
3.5. IDENTIFICACIÓN DE SAPONINAS.....	36
3.5.1. PRUEBA DE ESPUMA.....	36
3.6. MÉTODOS BIOLÓGICOS.....	36
3.6.1. ETAPAS DE AMBIENTACIÓN Y ALIMENTACIÓN DE LOS ANIMALES.....	36
3.6.2. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	37
3.6.3. PRODUCCIÓN EXPERIMENTAL DE HIPERGLUCEMIA POR ESTREPTOZOTOCINA.....	38
3.6.4. ELABORACIÓN Y DOSIFICACIÓN DE TRATAMIENTOS.....	38
3.6.5. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA SANGUÍNEA.....	39
3.6.6. MEDICIÓN DE LA GLUCEMIA.....	40
3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	41
3.7.1. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA).....	42
3.7.2. PRUEBA TUKEY.....	42
3.8 ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO.....	42
3.8.1. ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO DE PÁNCREAS E HÍGADO.....	42
CAPÍTULO III.....	45
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
1. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS BLANDOS DE HOJAS DE MORINGA...	45
1.1. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS.....	45
2. RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS BLANDOS.....	46
3. ANÁLISIS FITOQUÍMICO.....	47
3.1 IDENTIFICACIÓN DE GRUPOS DE METABOLITOS SECUNDARIOS POR CCF.....	47
3.1.1. CORRIDA GENERAL.....	48

3.1.2. IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES.....	50
3.1.3. IDENTIFICACIÓN DE TANINOS.....	52
3.1.4. IDENTIFICACIÓN DE ALCALOIDES.....	52
4. IDENTIFICACIÓN DE SAPONINAS.....	53
5. ESTUDIO DEL EFECTO HIPOGLUCEMIANTE.....	54
5.1 EVALUACIÓN DEL PESO.....	55
5.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES...56	
5.2.1. EVALUACIÓN DE LA GLUCOSA BASAL.....	56
5.2.2. EVALUACIÓN GLUCOSA POST-STZ (DÍA 0).....	58
5.2.3. EVALUACIÓN GLUCOSA DÍA 5.....	59
5.2.4. EVALUACIÓN GLUCOSA DÍA 10.....	61
5.2.5. EVALUACION GLUCOSA DÍA 15.....	62
5.2.6. EVALUACIÓN GLUCOSA DÍA 20.....	64
5.2.7. EVALUACIÓN GLUCOSA DÍA 25.....	65
5.2.8. EVALUACIÓN GLUCOSA DÍA 30.....	66
5.2.9. EVOLUCIÓN DE LOS NIVELES DE GLUCOSA DURANTE 30 DÍAS DE TRATAMIENTO.....	68
5.2.10. COMPARACIÓN DE AREAS BAJO LA CURVA DE LOS DIFERENTES TRAMIENTOS DURANTE EL TIEMPO DE TRATAMIENTO.....	70
5.2.11 FLUCTUACIÓN DE LOS NIVELES DE GLUCOSA DURANTE 30 DÍAS DE TRATAMIENTO.....	72
6. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO.....	73
CAPÍTULO IV.....	79
CONCLUSIONES.....	79
RECOMENDACIONES.....	80
BIBLIOGRAFÍA.....	81
ANEXOS.....	90

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N° 1: Árbol de <i>Moringa oleífera</i> Lam.....	1
FIGURA N° 2: Partes de <i>Moringa oleífera</i> Lam	2
FIGURA N° 3: Estructura química de flavonoides presentes en la Moringa.....	3
FIGURA N° 4: Fisiología del páncreas.....	4
FIGURA N° 5: Histología del páncreas endocrino y exocrino.....	4
FIGURA N° 6: Histología páncreas endocrino.....	5
FIGURA N° 7: Estructura de la insulina.....	6
FIGURA N° 8: Estructura química de la Metformina.....	19
FIGURA N° 9: Estructura química de Estreptozotocina.....	21
FIGURA N° 10: Árbol de Moringa cultivado en El Pedregal-Arequipa.....	26
FIGURA N° 11: Recolección y selección de las hojas de Moringa del árbol.....	26
FIGURA N° 12: Tallos y hojas de Moringa lavados.....	27
FIGURA N° 13: Hojas de Moringa secadas a estufa.....	27
FIGURA N° 14: Proceso de pulverización de hojas de Moringa.....	28
FIGURA N° 15: Equipo de Extracción por Soxhlet.....	29
FIGURA N° 16: Extracción mediante Soxhlet.....	30
FIGURA N° 17: Equipo de rotavapor.....	31
FIGURA N° 18: Procedimiento de cromatografía en capa fina.....	35
FIGURA N° 19: Placa de sílica gel con analitos separados.....	35
FIGURA N° 20: Distribución y estandarización de animales de experimentación....	36
FIGURA N° 21: Esquema de diseño experimental.....	37
FIGURA N° 22: Administración de la Solución de Estreptozotocina por vía IP.....	38
FIGURA N° 23: Pesada de los animales.....	39
FIGURA N° 24: Administración de tratamientos.....	39
FIGURA N° 25: Obtención de la muestra de sangre.....	40
FIGURA N° 26: Glucómetro Accu-Chek® Performa.....	40
FIGURA N° 27: Laminillas terminadas tinción Hematoxilina – eosina.....	44
FIGURA N° 28: Extracto etanólico blando de hojas de Moringa.....	45
FIGURA N° 29: Porcentaje de rendimiento de los extractos de Moringa con diferentes solventes.....	47
FIGURA N° 30: Cromatofolio de identificación general del extracto etanólico.....	48

FIGURA N° 31: Cromatofolio de identificación general del extracto acetato de etilo.....	49
FIGURA N° 32: Cromatofolio de identificación general del extracto éter etílico....	50
FIGURA N° 33: Cromatofolio de flavonoides de los tres extractos.....	51
FIGURA N° 34: Cromatofolio de taninos de los tres extractos.....	52
FIGURA N° 35: Cromatofolio de alcaloides de los tres extractos	53
FIGURA N° 36: Prueba de espuma.....	54
FIGURA N° 37: Evolución de los pesos promedio (g) de los diferentes grupos experimentales durante el tratamiento.....	56
FIGURA N°38: Comparación de la concentración de glucosa basal (mg/dL) entre los grupos experimentales.....	57
FIGURA N°39: Comparación de la concentración de glucosa (mg/dL) post-estreptozotocina entre los grupos experimentales.....	58
FIGURA N°40: Comparación de la concentración de glucosa (mg/dL) al 5to día entre los grupos experimentales a diferentes tratamientos.....	60
FIGURA N° 41: Comparación de la concentración de glucosa (mg/dL) al 10mo día entre los grupos experimentales a diferentes tratamientos.....	62
FIGURA N° 42: Comparación de la concentración de glucosa (mg/dL) al 15vo día entre los grupos experimentales a diferentes tratamientos.....	63
FIGURA N° 43: Comparación de la concentración de glucosa (mg/dL) al 20vo día entre los grupos experimentales a diferentes tratamientos.....	65
FIGURA N° 44: Comparación de la concentración de glucosa (mg/dL) al 25vo día entre los grupos experimentales a diferentes tratamientos	66
FIGURA N° 45: Comparación de la concentración de glucosa (mg/dL) al 30vo día entre los grupos experimentales a diferentes tratamientos.....	67
FIGURA N° 46: Evolución de los niveles de glucosa promedio (mg/dL) de los diferentes grupos experimentales durante el tratamiento.....	69
FIGURA N° 47: Comparación del área bajo la curva de los diferentes tratamientos.....	72
FIGURA N° 48: Efecto de concentración de moringa sobre fluctuaciones de glucosa (mg/dL) después de 30 días de tratamiento.....	73

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N° 1: Clasificación taxonómica de la especie.....	2
TABLA N° 2: Fase móvil empleada para la identificación de metabolitos.....	35
TABLA N° 3: Características organolépticas de los extractos obtenidos.....	45
TABLA N° 4: Promedio de los rendimientos de los extractos.....	46
TABLA N° 5: Evolución de los pesos (g) promedio de los diferentes grupos experimentales durante el tratamiento.....	55
TABLA N° 6: Comparación de la concentración de glucosa basal (mg/dL) entre los grupos experimentales.....	57
TABLA N°7: Comparación de la concentración de glucosa (mg/dL) post- estreptozotocina entre los grupos experimentales.....	58
TABLA N° 8: Comparación de la concentración de glucosa (mg/dL) al 5to día entre los grupos experimentales a diferentes tratamientos.....	59
TABLA N° 9: Comparación de la concentración de glucosa (mg/dL) al 10mo día entre los grupos experimentales a diferentes tratamientos.....	61
TABLA N° 10: Comparación de la concentración de glucosa (mg/dL) al 15vo día entre los grupos experimentales a diferentes tratamientos.....	62
TABLA N° 11: Comparación de la concentración de glucosa (mg/dL) al 20vo día entre los grupos experimentales a diferentes tratamientos.....	64
TABLA N° 12: Comparación de la concentración de glucosa (mg/dL) al 25vo día entre los grupos experimentales a diferentes tratamientos.....	65
TABLA N° 13: Comparación de la concentración de glucosa (mg/dL) al 30vo día entre los grupos experimentales a diferentes tratamientos.....	67
TABLA N° 14: Evolución de los niveles de glucosa promedio (mg/dL) de los diferentes grupos experimentales durante el tratamiento.....	69
TABLA N° 15: Comparación del área bajo la curva de diferentes tratamientos.....	71
TABLA N°16: Efecto de concentración de moringa sobre fluctuaciones de glucosa (mg/dL) después de 30 días de tratamiento.....	72
TABLA N°17: Estudio histopatológico de páncreas de los grupos de experimentación.....	74
TABLA N°18: Estudio histopatológico de hígado de los grupos de experimentación.....	76

ABREVIATURAS

%Re: Porcentaje de rendimiento

ADN: Ácido desoxiribonucleico

ANOVA: Analisis de varianza

CCF: Cromatografía en capa fina

DCR: Diseño completamente al azar

DM: Diabetes *mellitus*

DM1: Diabetes *mellitus* tipo 1

DM2: Diabetes *mellitus* tipo 2

EC: Enfermedades crónicas

EEtMO: Extracto etanólico de *Moringa oleífera* Lam.

GLUT-2: Transportador de glucosa-2

H&E: Hematoxilina- Eosina

HUSA: *Herbarium arequipense*

NO: Oxido nitroso

OMS: Organización mundial de la salud

PTGO: Prueba de tolerancia oral a la glucosa

Rf: Factor de refencia

STZ: Estreptozotocina

UV: Ultravioleta

INTRODUCCIÓN

Según la Organización Mundial de Salud (OMS), alrededor del 80% de las personas confían en la medicina tradicional para resolver sus necesidades principales de salud, esta es parte esencial de la cultura de los pueblos y ha sido guardián de generaciones pasadas. El 25 % de los fármacos actuales tiene como origen una extracción vegetal o esta sintetizado a partir de sustancias halladas en investigación fitoquímica, es por esto que la investigación de plantas medicinales en la última década ha adquirido auges insospechados.¹

El género *Moringa* comprende trece especies, de las cuales *Moringa oleífera* Lam., es la más conocida. Se le han atribuido propiedades a la totalidad de la planta, las hojas y semillas son las más usadas por sus propiedades nutritivas, anticancerígenas, hipotensoras, hipoglucemiantes, y antibióticas.²

Una de las enfermedades crónicas (EC) es la diabetes *mellitus* (DM), entendida como un grupo de enfermedades metabólicas, caracterizada por la hiperglucemia resultado de la nula y/o anormal secreción de la insulina. Esta enfermedad afecta comúnmente a personas mayores a los 40 años de edad, y la forma clínica con mayor frecuencia es la diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), también pueden presentarse a cualquier edad, con bases inmunológicas, la diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1).³

La prevalencia de EC han ido en aumento en los últimos 25 años, con evidencia en los países en desarrollo, con un impacto en la morbilidad, costos sanitarios y productividad. Según la OMS en el 2030 la DM será la séptima causa de mortalidad a nivel mundial. En el Perú, el 11% de muertes corresponde a una de las principales EC y el 66% del total de muertes son atribuidas a este tipo de enfermedades.³

En nuestro país, se evidencia a la DM como un problema creciente de salud pública. La DM afecta al 7% de la población en el Perú, mientras que la DM2 corresponde al 96.8% de los casos, y la DM1 tiene una incidencia de 0.4/100000/año.⁴

Esta información estadística fue impulso a la realización del presente trabajo de investigación, además el objetivo de estudiar la propiedad hipoglucemiante que es buenamente atribuida a *Moringa oleífera* Lam, como una alternativa complementaria en el manejo de esta enfermedad.

HIPÓTESIS

Se conoce que la medicina tradicional le atribuye propiedades curativas a *Moringa oleífera* Lam “Moringa” sobre la hiperglucemia, por lo cual es probable que el extracto de hojas de esta planta presenten un efecto hipoglucemiante en hiperglucemia inducida en animales de experimentación.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- ❖ Evaluar el efecto hipoglucemiante del extracto de hojas de *Moringa oleífera Lam.* en hiperglucemia inducida en animales de experimentación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Obtener el extracto de hojas de *Moringa oleífera Lam* con solventes de diferente polaridad y evaluar el rendimiento de cada uno.
2. Identificar los grupos de metabolitos secundarios presentes en los extractos de hojas de *Moringa oleífera Lam*, mediante un análisis fitoquímico preliminar.
3. Evaluar la actividad hipoglucemiante del extracto etanólico de las hojas de *Moringa oleífera Lam*. en animales de experimentación inducidos a hiperglucemia por Estreptozotocina.
4. Determinar las dosis efectiva del extracto etanólico de *Moringa oleífera Lam*. propia del efecto hipoglucemiante en animales de experimentación.
5. Comparar el efecto del extracto de hojas de *Moringa oleífera Lam* en dosis de 350 y 500 mg/Kg frente a Metformina a una dosis de 350 mg/Kg.
6. Realizar el estudio histopatológico de páncreas e hígado en los animales de experimentación al término de los tratamientos.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1. *Moringa oleífera* Lam (MORINGA)

Moringa oleífera Lam, pertenece a la familia *Moringaceae*, árbol que crece principalmente en zonas semiáridas, tropicales y subtropicales, nativo del sur de Asia, también África y el Medio Oriente; cultivado ampliamente en América Central, desde México, y América del Sur, hasta Perú, Paraguay y Brasil.^{5,6}

Es un árbol delgado con ramas caídas que alcanza una altura de 10-15 metros, con una corteza gruesa, corchosa y fisurada, crece rápidamente incluso en suelos pobres y adaptable a sequías. Las hojas son compuestas, pinnadas y elípticas dispuestas sobre un raquis en donde se observa una pequeña glándula, presentan flores fragantes en panículas grandes, las vainas en forma de péndulo presentan un aspecto verdoso, largo y acanalado con las semillas.^{2,5}



FIGURA N° 1: Árbol *Moringa oleífera* Lam.

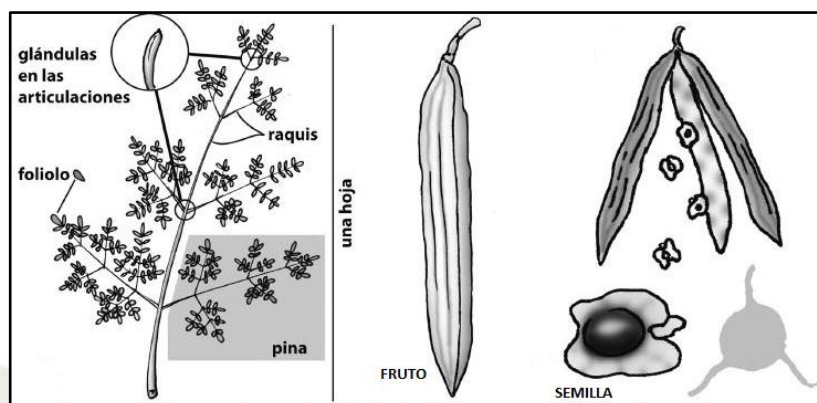


FIGURA N°2: Partes de *Moringa oleífera* Lam.²

1.1. CLASIFICACIÓN DE LA ESPECIE

Según *Angiosperm Phylogeny Group IV*, la especie se encuentra dentro de la siguiente clasificación:⁷

TABLA N° 1. Clasificación taxonómica de la especie

DIVISIÓN	<i>Angiospermae</i>
Clase	<i>Eudicots</i>
Subclase	<i>Rosids</i>
Orden	<i>Brassicales</i>
Familia	<i>Moringaceae</i>
Género	<i>Moringa</i>
Especie	<i>Moringa oleífera</i> Lam.

1.2. COMPOSICIÓN QUÍMICA

Se han identificado en la totalidad de la planta: proteínas, fibras, carbohidratos, aminoácidos, vitaminas (A, E y C), carotenos, tocoferoles y minerales (Ca, Mg, P) y como elemento más abundante el potasio.⁸

En diversas partes de la planta se han logrado identificar metabolitos como: taninos, saponinas, polifenoles (flavonoides tales como kaempferol, quercetina, mirecetina, isoramnetina), glucosidos fenólicos, glucosidos

cardiacos, isotiocianatos, esteroides y glucosteroides, también se han descrito metabolitos minoritarios como glucosinolatos y derivados de urea.^{9,10}

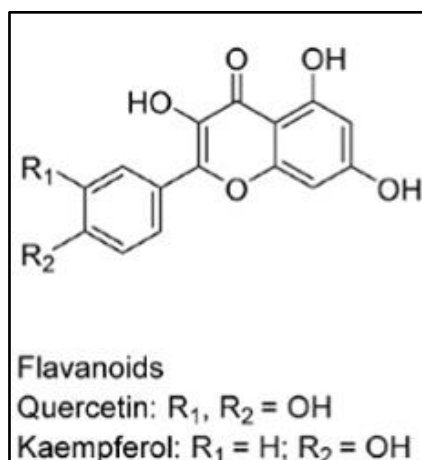


FIGURA N°3: Estructura química de flavonoides presentes en la *Moringa*⁸⁴

Los flavonoides como quercetina y kaempferol o ácidos fenólicos como el ácido clorogénico son fitoquímicos reportados con acción antioxidante, hipoglucemiante, hipotensora, antidislipidémico y antiinflamatorias.¹¹

Las hojas de *Moringa oleífera* Lam, contienen aminoácidos esenciales, incluidos aquellos que contienen azufre, con patrones similares a las semillas de soja, además de presentar cantidades importantes de vitaminas A, B y C, Ca⁺², Fe y proteínas.^{6,12}

1.3. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS

Ha sido utilizada en el tratamiento de problemas cardiacos, además de sus mencionadas propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antimicrobianas, antiulcerosas, hepatoprotectoras, hipocolesterolemiantes, cardioprotectoras y antidiabéticas.¹³

Es también de gran uso por sus propiedades nutritivas y para el equilibrio de la hormona tiroidea.¹⁴

La actividad antibacteriana buenamente atribuida indican actividad contra bacterias Gram negativas (*Escherichia coli* y *Salmonella typhi*), Gram

positivas y actividad antiviral, como también actividad inhibitoria del desarrollo de larvas.¹⁵

2. PÁNCREAS

El páncreas humano es una glándula lobulada mixta color rosa grisáceo, con una longitud de 12 a 15 cm y un peso de 100g, se extiende en sentido casi transversal sobre la pared abdominal exterior, desde el duodeno hasta el bazo, detrás del estómago.¹⁶

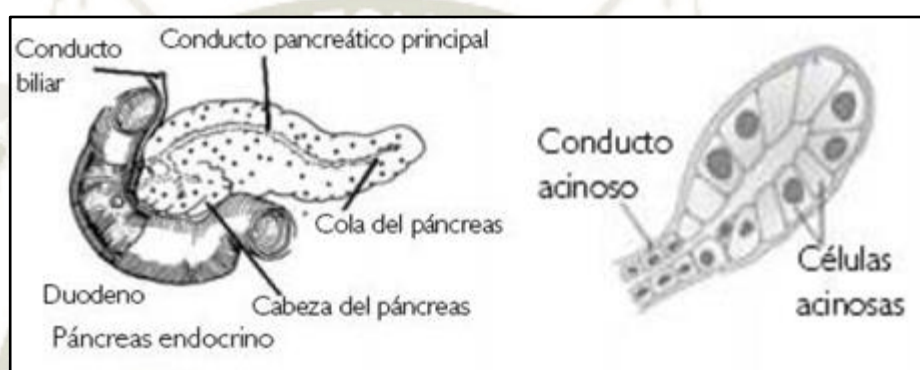


FIGURA N° 4: Fisiología del páncreas²⁹

Reúne funciones secretoras endocrinas y exocrinas, en donde las secreciones exocrinas son importantes en la digestión, mientras que las células endocrinas, que se encuentran en los islotes de Langerhans, desempeñan un función fundamental en la secreción de hormonas reguladoras del metabolismo, que son, la insulina, el glucágon, la somatostatina y el polipéptido pancreático, reguladoras de la glucosa en sangre.^{17,18}

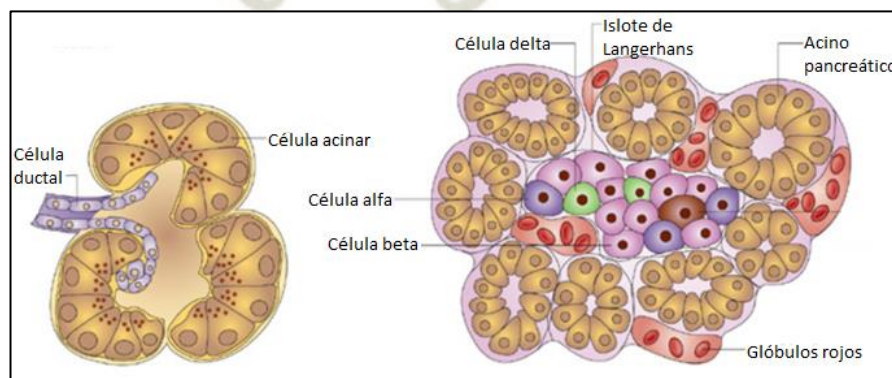


FIGURA N° 5: Histología del páncreas endocrino y exocrino.⁸⁵

2.1. PÁNCREAS EXOCRINO

Es la porción del páncreas que elabora y secreta enzimas digestivas en el duodeno, este incluye células acinares y células ductales, con tejido conectivo, vasos y nervios asociados. Los componentes exocrinos comprenden más del 95% de la masa pancreática.¹⁹

El páncreas exocrino responsable de la digestión de carbohidratos, proteínas y grasas, está controlado por señales nerviosas y hormonales que son producto de la presencia de ácido y productos de digestión en el duodeno.^{17,20}

2.2. PÁNCREAS ENDOCRINO

Están rodeadas por un conjunto de células ductales y acinares, propias del páncreas exocrino, se encuentran en pequeñas organizaciones de las células endocrinas especializadas, organizadas en islotes pancreáticos o islotes de Langerhans. Existen aproximadamente 1 millón de islotes pancreáticos en un páncreas adulto, donde cada islote posee una red capilar organizándose en torno a capilares en donde se vierten las hormonas, son más numerosos hacia la cola del páncreas, sin embargo, están distribuidos en la totalidad del órgano. Estos islotes representan aproximadamente el 1% del peso del páncreas.^{21,22}

2.2.1. HISTOLOGÍA DEL PÁNCREAS ENDOCRINO

En los islotes pancreáticos se diferencian cuatro tipos de células principales, por sus características morfológicas y secretoras:²³

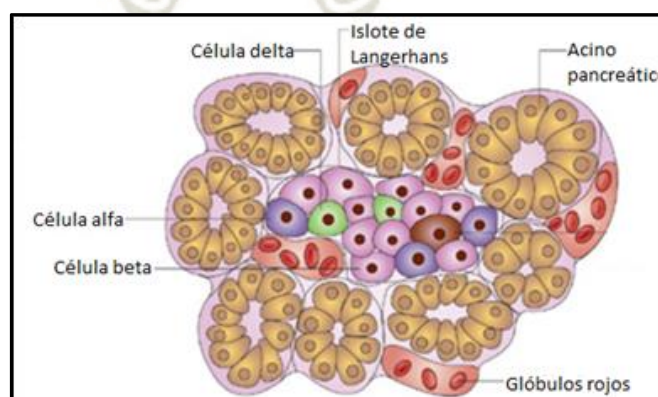


FIGURA N° 6: Histología páncreas endocrino⁸⁵

2.2.1.1. CÉLULAS BETA (β):

Son las células de mayor importancia dentro del islote pancreático ya que son responsables de la secreción de insulina, representan de un 60 a 70 % del total de células presentes en los islotes.^{24,25}

❖ INSULINA:

Hormona polipeptídica secretada por las células β de los islotes pancreáticos constituida por dos cadenas, de 21 (cadena A) y 30 (cadena B) aminoácidos, unidas por unidades bisulfuradas que provienen de grupos cistínicos de ambas cadenas.²⁶

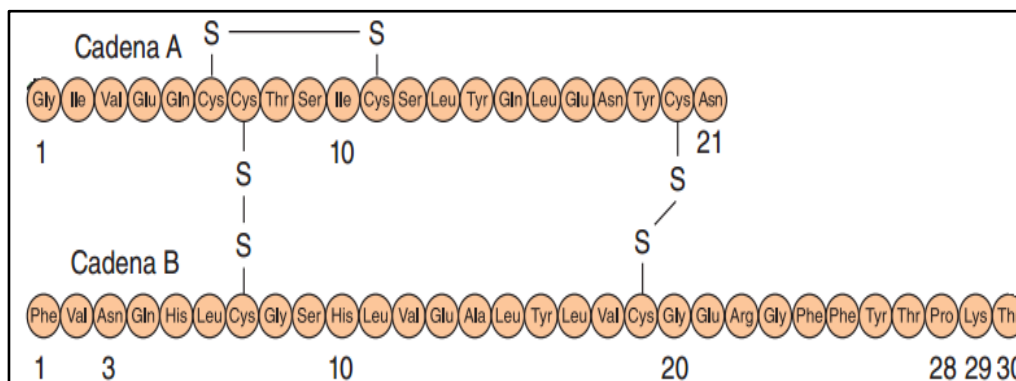


FIGURA N° 7: Estructura de la insulina²⁹

- SÍNTESIS Y SECRECIÓN:

La síntesis de insulina es codificada por el gen ubicado en el cromosoma 11, el primer péptido resultante de la transcripción y traducción es la pre-proinsulina la cual por acción de una peptidasa da lugar a la proinsulina, que se pliega y después forma los puentes entre las cadenas A y B, se une el péptido C, formándose la molécula de insulina madura, generando la insulina.²¹

La secreción de insulina es activada por diferentes señales como consecuencia de la llegada del alimento y su posterior absorción al tubo digestivo, como son: aumento de niveles de glucosa u otros metabolitos en plasma, secreción de hormonas gastrointestinales, entre otros.²¹

-MECANISMO DE ACCIÓN Y EFECTOS:

El receptor de insulina está situado en la membrana celular, es un tetrámero formado por dos subunidades glucoproteicas α y dos β , las subunidades α se unen a la insulina son extracelulares y variables (hígado, músculo y tejido adiposo), las subunidades β cruzan la membrana, en donde sus porciones intracelulares tienen actividad cinasa de tirosina.^{27,28}

La unión de la insulina activa la cinasa de la tirosina de las subunidades β , esto produce autofosforilación de estas subunidades en los residuos de tirosina, proceso importante para la acción biológica de la insulina, ya que inicia la fosforilación de algunas proteínas citoplasmáticas y desfosforilación de otras, principalmente en residuos de treonina y serina.^{26,28}

Las acciones que desarrolla son:

✓ En el hígado:

Reversión de los signos catabólicos de la deficiencia insulínica al inhibir la glucogenólisis, la conversión de ácidos grasos y aminoácidos en cetoácidos y la conversión de aminoácidos en glucosa.

Además de la acción anabólica al estimular el almacenamiento de glucosa en la forma de glucógeno, ya que induce la acción de la glucocinasa y la glucógeno sintasa, e inhibir la fosforilasa. Además intensifica la síntesis de triglicéridos y la formación de lipoproteínas de muy baja densidad.²⁹

✓ En músculos:

Incrementa la síntesis de proteínas al aumentar el transporte de aminoácidos, e incrementar la síntesis de proteínas ribosómicas.

Aumenta la síntesis de glucógeno al incrementar el transporte de glucosa e inducir la acción de la glucógeno sintasa e inhibir la fosforilasa.²⁹

✓ En el tejido adiposo:

Estimula el aumento de almacenamiento de triglicéridos al inducir la acción de la lipoproteína lipasa y es activada por la insulina para hidrolizar triglicérido a partir de lipoproteínas.

Además de la penetración de glucosa en la célula hace que el fosfato de glicerol permita la esterificación de ácidos grasos aportados por el transporte de lipoproteínas.

Ademas a este nivel la insulina inhibe la lipasa intracelular.²⁹

2.2.1.2. CÉLULAS ALFA (α):

Células endocrinas ubicadas en los islotes pancreáticos, constituyen del 20-30% de las células de los islotes. A nivel microscópico se los puede observar como gránulos de núcleos densos y periferie blanca, junto a las células delta y normalmente rodeando a células beta. Los gránulos secretores contienen glucagón que es la hormona que regula la glucosa en caso de detectar una disminución de esta en sangre.²¹

❖ GLUCAGÓN:

Péptido lineal de 29 aminoácidos secretado por las celulas alfa de los islotes pancreáticos, realiza la función de aumentar los niveles de glucosa através de la estimulación de los hepatocitos.³⁰

-SÍNTESIS Y SECRECIÓN:

El gen responsable de su codificación se encuentra en el cromosoma 2 humano, el producto final se trata de una cadena polipeptídica de 180 aminoácidos llamada proglucagón, esta es capaz de liberar glucagón y otros péptidos, por un proceso post-traducciona²¹.

La secreción de glucagón es regulada principalmente por nutrientes y hormonas, la glucosa y la insulina son los estímulos más importantes. El glucagón tiene un efecto directo, no mediado por la insulina, mientras que la insulina un efecto indirecto. Además de la regulación por glucemia, es respuesta a la ingesta por acción de hormonas gastrointestinales con efecto estimulador o inhibidor. También tiene regulación neural por medio de neurotransmisores, es así que el sistema simpático inhibe secreción de insulina y estimula la de glucagón.³⁰

- EFECTOS:

Las acciones del glucagón se dan principalmente en tejido adiposo y el hígado:

- ✓ Estimula la glucogenólisis e inhibe la glucogenogénesis.
- ✓ Estimula la gluconeogénesis e inhibe la glucólisis
- ✓ Inhibe la lipogénesis al reducir la concentración de malonil-CoA, el primer producto intermedio de la lipogénesis.
- ✓ Favorece la cetosis, permitiendo que los ácidos grasos sean transportados a las mitocondrias, donde serán oxidados a cuerpos cetónicos.^{21,30}

La secreción coordinada de insulina y glucagón por el islote determina el mantenimiento de la glucemia.³⁰

2.2.1.3. CÉLULAS DELTA (δ)

Las células delta constituyen aproximadamente el 10% del total de células de los islotes pancreáticos, son encargadas de la producción y secreción de la hormona somatostatina.¹⁶

❖ SOMATOSTATINA:

Péptido de 14 aminoácidos con estructura cíclica por la unión intramolecular de residuos de cisteína.³⁰

-SÍNTESIS Y SECRECIÓN: La hormona es sintetizada a nivel de los islotes pancreáticos, células neuroendocrinas (SNC) y la mucosa gastrointestinal. El precursor común es la preprosomatostatina, que es convertida a prosomatostatina y finalmente a somatostatina-14, que predomina en el páncreas y nervios del intestino, o somatostatina-28, presente en la mucosa digestiva, es estimulada por nutrientes, como la glucosa y aminoácidos, péptidos digestivos, como secretina o gastrina.³⁰

-EFECTOS:

- ✓ En el páncreas la somatostatina inhibe la secreción de insulina, glucagón y polipéptido pancreático, a través de una acción paracrina y es capaz de su autorregulación por una acción autocrina.
- ✓ Tiene un efecto sobre el páncreas exocrino al disminuir la secreción de bicarbonato y enzimas digestivas.³⁰

3. GLUCEMIA

Definida como la concentración de glucosa contenida en la sangre, expresado normalmente en miligramos por decilitro (mg/dL). La concentración de glucosa varía de acuerdo a los alimentos ingeridos o el estado de ayuno, en estado de

ayuno este valor se encuentra en el rango de 70 y 110 mg/dL, si los valores están por debajo o encima de los mencionados, se tratará de hipoglucemia o hiperglucemia respectivamente.³¹

Los valores de glucosa indicarán cierto desorden en el metabolismo de glucosa, por ejemplo, en el estado de ayuno valores mayores o iguales a 126 mg/dL en ayunas podrán tratarse de un estado inicio de diabetes; por otro lado existen pruebas como la tolerancia oral a la glucosa en donde un valor mayor a 200 mg/dL después de la carga de glucosa oral también indicará un estado inicial de diabetes..³¹

4. HIPERGLUCEMIA

Término utilizado para hacer referencia los altos niveles de azúcar en sangre, esto se da cuando la cantidad de la hormona insulina es insuficiente o muy escasa. La hiperglucemia también se da cuando el organismo no hace un correcto uso de la hormona insulina. La causas son variables y puede darse en la diabetes *mellitus* de cualquier tipo ó también por una ingesta excesiva de alimentos sin el desgaste requerido.³²

5. DIABETES MELLITUS

La diabetes *mellitus* (DM), definida por un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por la hiperglucemia como resultado de defectos en la secreción o acción de insulina, o ambas. La DM puede cursar con síntomas característicos como polidipsia, poliuria, disminución de la agudeza visual, y pérdida de peso. La hiperglucemia crónica en la DM está asociada con daño a largo plazo, disfunción, y fallo de diferentes órganos, especialmente los ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos. En sus formas más severas se presenta cetoacidosis, o un estado hiperosmolar no-cetónico que puede causar un estado de coma y, en ausencia de un tratamiento efectivo, la muerte.³³

Diferentes procesos patogénicos están inmersos en el desarrollo de la diabetes. Incluyen desde la destrucción autoinmune de células del páncreas y como resultado la deficiente secreción de insulina hasta anormalidades que resultan en la resistencia a la acción de la insulina.³⁴

5.1. CLASIFICACIÓN DE LA DIABETES *MELLITUS*

Es importante para el manejo clínico de la diabetes, además de su investigación epidemiológica y clínica, un sistema apropiado de clasificación es así que la Organización Mundial de la Salud (OMS) y un grupo de estudio de la OMS sobre DM, reconocen dos formas principales de diabetes que son llamadas, insulino-dependiente diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) y la no insulino-dependiente diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2).³⁵

La clasificación etiológica de la DM es:

- ✓ Diabetes *mellitus* tipo 1
- ✓ Diabetes *mellitus* tipo 2
- ✓ Diabetes gestacional
- ✓ Otros tipos específicos³⁵

5.1.1. DIABETES *MELLITUS* TIPO 1

También conocido como diabetes insulino-dependiente, actualmente es subdivida en dos tipos:

❖ DIABETES AUTOINMUNE:

O también llamada diabetes juvenil, que afecta solo del 5-10% de la población diabética, resulta de la destrucción selectiva autoinmune de las células β del páncreas mediada por linfocitos T activados.³³

Se cree que los determinantes genéticos son importantes, expresados por la frecuencia aumentada o disminuida de ciertos antígenos de histocompatibilidad en el cromosoma 6.³⁶

En esta forma de DM la destrucción de células beta es variable, siendo rápida en niños y bebés, a diferencia de lo que ocurre en adultos, en donde la destrucción es lenta. Se presenta cetoacidosis, otros desarrollan hiperglucemia leve que cambia rápidamente a hiperglucemia grave y/o cetoacidosis en presencia de infección u otro estrés.^{33,37}

❖ DIABETES IDIOPÁTICA:

Algunas formas de DM1 no tienen etiología, evolución, ni pronóstico conocido, estos pacientes cursan con insulinopenia permanente y tendencia a la cetosis, pero no presentan evidencia autoinmune. Este tipo de DM es fuertemente hereditario, y un requisito absoluto para la terapia de reemplazo de insulina puede aparecer y desaparecer.^{33,36}

5.1.2. DIABETES *MELLITUS* TIPO 2

Denominada también diabetes no insulino-dependiente o del adulto (mayores a los 40 años), siendo el tipo más frecuente supone del 80-90% de todos los casos de DM ya sea en jóvenes, adolescentes y niños.³⁷

DM2 es un desorden heterogéneo con componentes genético y adquiridos, caracterizado por la función anormal de las células beta y diversos grados de resistencia a la insulina. Debida principalmente a la alteración de secreción de insulina, por tanto, la hiperglucemia resulta de la liberación excesiva de glucosa endógena por el aumento de la gluconeogenesis. La presentación clínica suele ser muy diversa, puede presentarse con la sintomatología típica de la hiperglucemia, desafortunadamente en gran parte de los casos el diagnóstico ha pasado desapercibido ante la ausencia de sintomatología acompañante y su tórpida evolución, entonces al momento de reconocer la enfermedad por primera vez ya son evidentes las lesiones propias de algunas complicaciones. Una gran proporción de pacientes con DM2 son obesos lo que generara resistencia a la insulina.³⁸

5.1.3. DIABETES GESTACIONAL

Comprende a toda aquella alteración del metabolismo hidrocarbonado diagnosticado por primera vez en el embarazo generalmente entre las semanas 24 y 28.³⁸

Puede persistir después del parto, en donde se asocia a trastornos en la madre, como hipertensión, infecciones vaginales y vías urinarias, parto prematuro, y daños graves al bebé.¹⁶

5.1.4. OTROS TIPOS ESPECÍFICOS DE DIABETES MELLITUS

La forma de presentación de estos tipos de DM varía enormemente dependiendo de la causa subyacente, en la mayoría la historia familiar, antecedentes patológicos acompañantes o la medicación recibida. Dentro de algunas causas podemos considerar:³⁸

- Defectos genéticos de la función de la célula beta.
- Defectos genéticos de la acción de la insulina.
- Enfermedades del páncreas exocrino.
- Endocrinopatías.
- Inducidas por fármacos o sustancias químicas.
- Infecciones.
- Formas infrecuentes de diabetes autoinmune.
- Otros síndromes en ocasiones asociados a diabetes.³⁸

5.2. SÍNTOMAS DE LA DIABETES

Los síntomas que cursan con DM habitualmente pasan desapercibidos hasta que se intensifican:

- ✓ Poliuria
- ✓ Polidipsia
- ✓ Polifagia
- ✓ Ganancia de peso
- ✓ Inusual pérdida de peso
- ✓ Fatiga aumentada
- ✓ Irritabilidad
- ✓ Disminución de la agudeza visual
- ✓ Infecciones de la piel o mucosas³⁹

5.3. DIAGNÓSTICO DE LA DIABETES

Un diagnóstico correcto estará basado en la sintomatología: poliuria, polidipsia o pérdida inexplicada de peso además de una glucemia elevada en cualquier momento del día, independiente del tiempo desde la última comida, este valor puede ser mayor o igual a 200mg/dL. Además de una glucemia en ayunas mayor a 126 mg/dL.¹⁶

Usualmente al diagnóstico de DM está basado en criterio de glucosa en plasma, además de glucosa en plasma en ayunas o el valor de glucosa plasmática a las 2 h después de una tolerancia oral a la glucosa (PTGO).⁴⁰

5.3.1. PRUEBA DE TOLERANCIA ORAL A LA GLUCOSA:

Medida de la glucemia en ayunas y a las dos horas después de una ingesta oral de 75 g de glucosa disueltos en 250 ml de agua fría, esta dosis deberá tener un ajuste en niños a una dosis de 1.75 Kg de glucosa/Kg de peso, no pasando los 75 g.¹⁶

Los resultados de este test se considerarán de la siguiente manera:^{16,41}

- Tolerancia normal a la glucosa, glucemia 2 horas post carga <140 mg/dL.
- Intolerancia a la glucosa, glucemia 2 horas post carga 140-199 mg/dL.
- Diabetes *mellitus*, glucemia 2 horas post carga \geq 200 mg/dL.

5.4. COMPLICACIONES DE LA DIABETES

5.4.1. COMPLICACIONES AGUDAS:

Están referidas a aquellas complicaciones que son reversibles, las más importantes a considerar son: la hipoglucemia e hiperglucemia, estado hiperosmolar hipoglucémico y cetoacidosis diabética.⁴²

a) HIPOGLUCEMIA: Es una de las complicaciones agudas más frecuente de la DM, está directamente relacionada con el tratamiento, esta se considera cuando los niveles de glucosa están por debajo de 60

mg/dL. La sintomatología varía de acuerdo a los niveles de glucosa van desde palidez, sudoración, palpitaciones, temblores y náuseas, hasta síntomas neuroglucopénicos que evolucionan hasta el coma en casos de hipoglucemia grave.⁴³

- b) **HIPERGLUCEMIA:** Corresponde a niveles de glucosa mayores a 200 mg/dL, asintomático y sin otras alteraciones metabólicas, esta complicación puede estar relacionada con errores en el tratamiento o algunas infecciones agudas.⁴²
- c) **ESTADO HIPEROSMOLAR HIPERGLUCEMICO:** Caracterizado por la deficiencia de insulina acompañado de deshidratación, en la cual se observa valores de glucosa mayores a 600mg/dL, en personas diagnosticadas con DM2 y mayores a 60 años.⁴²
- d) **CETOACIDOSIS DIABÉTICA:** Complicación propia de DM1, es resultado de un déficit parcial o total de la insulina, acompañado de niveles de glucosa mayores a 300mg/dL además de valores de cuerpos cetónicos elevados y acidosis.⁴²

5.4.2. COMPLICACIONES CRÓNICAS

En base a su fisiopatología estas se pueden dividir en complicaciones macrovasculares y microvasculares, es por esto la importancia de un buen control metabólico.⁴²

❖ COMPLICACIONES MICROVASCULARES:

- a) **RETINOPATÍA DIABÉTICA:** Producida por una alteración en la microvascularización de la retina, la cual es afectada con mayor frecuencia. Se puede presentar tanto en la DM1 y con mayor frecuencia en DM2.⁴⁴
- b) **NEFROPATÍA DIABÉTICA:** Causa principal de la insuficiencia renal y una de las complicaciones más importantes de las diabetes de larga evolución, se presenta con mayor frecuencia en DM2. Se caracteriza por signos clínicos en donde se evidencia albuminuria superior a 300 mg/24hr, hipertensión e insuficiencia renal progresiva.⁴⁴

- c) **NEUROPATÍA DIABÉTICA:** Es propia de los dos tipos de DM, en donde su prevalencia aumenta con el tiempo de evolución de la enfermedad y la edad del paciente, además guarda relación con el grado y duración de la hiperglucemia.⁴⁴

❖ **COMPLICACIONES MACROVASCULARES:**⁴⁴

- a) Cardiopatía isquémica
- b) Enfermedad arterial periférica
- c) Enfermedad cerebrovascular
- d) Aterosclerosis generalizada
- e) Pie diabético

6. TRATAMIENTO DE LA DIABETES

6.1. TRATAMIENTO NO FARMACOLÓGICO DE LA DIABETES

Recomendado para el paciente que cursa con DM2, con obesidad, ya que al cumplir con este tipo de tratamiento se puede controlar una gran parte de los síndromes metabólicos que incluyen la hiperglucemia, resistencia a la insulina, hipertrigliceridemia e hipertensión arterial.⁴²

La reducción del peso corporal deberá ser un objetivo del manejo del paciente diabético con sobrepeso. El tratamiento no farmacológico comprende tres aspectos básicos:⁴²

- a) **PLAN DE ALIMENTACIÓN:** Debe ser personalizado y fraccionado, el consumo de sal deberá ser moderado, y contener una alta cantidad de fibra soluble.⁴²
- b) **EJERCICIO FÍSICO:** Debe ser personalizado, se recomienda el ejercicio aeróbico: caminar, trotar, que generará gasto calórico.⁴²
- c) **HÁBITOS SALUDABLES:** Es importante una supresión del consumo de tabaco y alcohol, ya que el riesgo de desarrollar complicaciones macrovasculares se ve intensificado.⁴²

6.2. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DE LA DIABETES

El tratamiento farmacológico está basado en el uso de antidiabéticos orales y de insulina en diferentes presentaciones.⁴⁵

El tratamiento inicial de DM2 consiste en el empleo de hipoglucemiantes orales, en donde se consideran los siguientes grupos principales de fármacos: sulfonilureas, biguanidas, tiazolidinedionas e inhibidores de α -glucosidasa.⁴⁶

6.2.1. SULFONILUREAS:

Fármacos secretagogos, ampliamente utilizados por su eficacia y bajo costo. Se dividen en dos generaciones de fármacos, todos los medicamentos de esta clase son arilsulfonilureas sustituidas a nivel del anillo bencénico y en un residuo de nitrógeno de la mitad de urea. Se dividen de la siguiente manera:⁴⁷

- Primera generación:⁴⁷
 - ❖ Tolbutamida
 - ❖ Acetohexamida
 - ❖ Tolazamida
 - ❖ Clorpropamida
- Segunda generación:⁴⁷
 - ❖ Glibenclamida
 - ❖ Glipizida
 - ❖ Glicazida
 - ❖ Glimepirida

El efecto adverso importante que presentan son: la hipoglucemia, su mecanismo de acción primario es la liberación de insulina a partir de células β pancreáticas a través de su unión a un canal de potasio dependiente de ATP.

Generalmente se da una terapia combinada de estos con biguanidas, ya que aumentarían la efectividad terapéutica.^{51,52}

6.2.2. BIGUANIDAS

Grupo de fármacos que reducen los niveles de glucosa sin aumentar la secreción de insulina, aunque pueden producir hipoglucemia, también disminuyen los niveles de lípidos circulantes y contribuyen a la disminución de peso en obesos.⁴⁶

Las biguanidas actúan a nivel de los músculos estimulando la entrada de glucosa a las células, y a nivel de hígado disminuyendo la producción de glucosa; los procesos de neoglucogenesis, glucogenolisis o ambos se ven disminuidos.⁴⁵

- **METFORMINA:** Introducida en 1957, utilizada ampliamente, es administrada sola o en combinación con sulfonilurea para una efectividad terapéutica mayor.⁴⁷

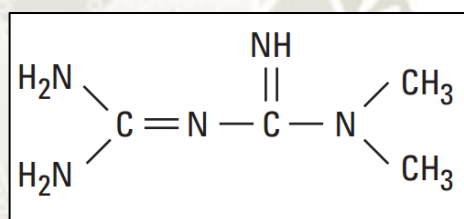


FIGURA N° 8: Estructura química de la metformina²⁹

Respecto a su mecanismo de acción, no posee acción sobre células pancreáticas, disminuyendo la glucosa al disminuir la producción hepática de glucosa aumentando la sensibilidad de la insulina a nivel de músculo y grasa, además de una reducción en el proceso de gluconeogénesis. Se absorbe a partir del intestino delgado, no se une a proteínas plasmáticas y es excretada por la orina sin cambios. Contraindicada en pacientes con insuficiencia renal, hepatopatías, antecedente de acidosis láctica e insuficiencia cardíaca.⁴⁷

6.2.3. TIAZOLIDINEDIONAS

Los compuestos conocidos dentro de este grupo de fármacos son: troglitazona, rosiglitazona y pioglitazona, actúan a nivel muscular y hepático,

aumentando el transporte de glucosa hacia el tejido muscular y adiposo al incrementar la síntesis de formas específicas de las proteínas transportadoras de glucosa, y la translocación de las mismas.^{45,47}

Son conocidos sus efectos adversos, por ejemplo la troglitazona que tenía efectos tóxicos graves sobre el hígado, también tienden a elevar el nivel de lipoproteínas de alta densidad (HDL), sin embargo, la terapia puede ser combinada con insulina u otros tipos de hipoglucemiantes orales. Contraindicado en pacientes con elevación de enzimas hepáticas tres veces mayor a los valores normales.⁴⁷

6.2.4. INHIBIDORES DE α -GLUCOSIDASA:

Actúan a nivel del cepillo del borde intestinal inhibiendo las enzimas responsables de la hidrólisis de oligosacáridos a monosacáridos y disacáridos los cuales posteriormente son absorbidos.⁵⁰ Como resultado se da un retraso en la absorción de polisacáridos, así este grupo de fármacos disminuyen la glucemia postprandial cuando la dieta es rica en carbohidratos, además se ha observado una disminución en el nivel de triglicéridos.⁵¹ Son tres los fármacos representantes: acarbosa, miglitol y vogliboza. Contraindicado para pacientes con insuficiencia cardíaca, insuficiencia hepática, elevación previa de transaminasas, anemia, colon irritable.⁴⁸

Los efectos secundarios más frecuentes son a nivel gastrointestinal: flatulencia, distensión abdominal, meteorismo, cólicos abdominales, diarreas, también se presentan ganancia de peso leve, retención hídrica y edema, además de elevación de enzimas hepáticas.⁴⁹

6.2.5. INSULINOTERAPIA

Término que se refiere a la administración exógena de insulina en pacientes diabéticos, esta insulina no se liberará directamente a la circulación portal, tampoco ocurrirán variaciones en los niveles de insulina como sería en una persona sana.⁵⁰ La insulización es la aplicación de insulina imitando en forma dinámica la secreción pancreática por lo que se usan dosis basales y preprandiales, con esquemas terapéuticos que varían según las necesidades de

cada paciente, este tratamiento observa en la DM 1 y en algún determinado momento para la DM 2, controlando las glucemias pre y postprandiales en donde los objetivos son:⁵¹

- Normalizar la glucosa en ayunas.
- Normalizar la glucemia postprandial.
- Minimizar el riesgo de hipoglucemia.
- Reducir el riesgo de complicaciones.
- Mantener niveles de Hemoglobina glucosilada entre 6-7%.
- Glucemias en ayunas y preprandiales entre 70-120 mg/dL .
- Glucemias postprandiales menores a 160 mg/dL.⁵¹

7. HIPERGLUCEMIA EXPERIMENTAL

7.1. ESTREPTOZOTOCINA

Químicamente el N-(metil-nitrosocarbamoil)- α -D-glucosamina, que cuenta con una fracción de nitrosurea entre un grupo metilo y una glucosamina, sintetizada por *Streptomyces achromogenes*, su presentación es en forma de polvo cristalino, y presenta solubilidad en agua, cloruro de sodio y alcohol.¹⁶

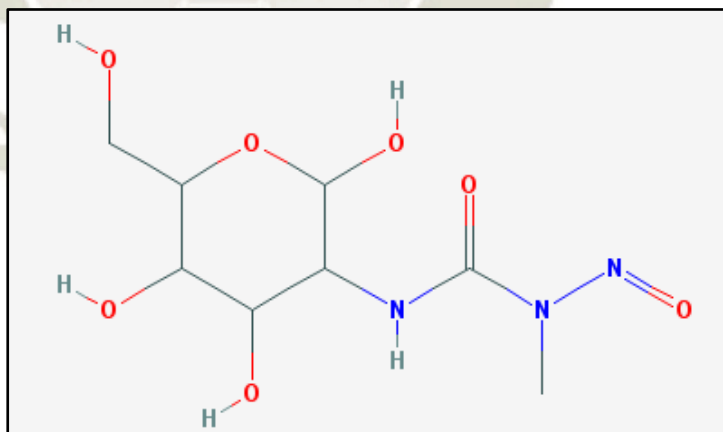


FIGURA N° 9: Estructura química de Estreptozotocina⁸⁶

Estreptozotocina (STZ), antibiótico antitumoral natural, indicado para el tratamiento de carcinoma metastásico de células de los islotes del páncreas, aprobado en 1982. Inicialmente fue utilizado para desarrollar en un modelo

experimental de DM1 en animales de experimentación, para posteriormente incluirlo como agente quimioterápico.⁵²

STZ puede administrarse en múltiples dosis bajas o una única dosis alta, las dosis varían de 35-60 mg/Kg. Se evidenciará una reducción en número y volumen de islotes que está ligado a la marcada disminución de secreción de insulina, por lo tanto un estado de hiperglucemia.⁵³

7.1.1. MECANISMO DE ACCIÓN

El modo de acción de STZ aun no está dilucidado, sin embargo, se le conoce un mecanismo que esta relacionado con el grupo N-nitrosourea presente en la molécula y que por descomposición química puede actuar como agente alquilante y/o donante de óxido nítrico (NO), la evidencia bioquímica expone que el NO se ve aumentado en las células β pancreáticas por acción de la STZ. Estudios recientes han demostrado la selectividad de STZ a través del transportador GLUT-2 que internaliza la STZ a las células β pancreáticas.⁵⁴

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

1. LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN

El estudio fue realizado en el Bioterio de la Universidad Católica de Santa María; la indagación cromatográfica y obtención del extracto de hojas en los laboratorios de Farmacognosia y Farmacotecnia entre los meses de Marzo - Agosto del 2018.

2. MATERIALES

2.1. MATERIAL VEGETAL

- Hojas de *Moringa oleífera* Lam “Moringa”, procedentes de El Pedregal, Distrito Majes, Provincia Caylloma, Arequipa – Perú.

2.2. MATERIAL BIOLÓGICO

- Ratas machos Wistar las cuales tenían un peso entre 271-402 g de 5 meses de edad, procedentes del Bioterio de la Universidad Católica de Santa Maria.

2.3. EQUIPOS DE LABORATORIO

- ✓ Glucómetro Accu-Check® Performa (Roche).
- ✓ Tiras reactivas Accu-Check® Performa (Roche).
- ✓ Equipo de extracción Soxhlet.
- ✓ Equipo de Rotavapor.
- ✓ Balanza Analítica.
- ✓ Balanza para pesar ratas.
- ✓ Cocina eléctrica.
- ✓ Lámpara de luz UV.

2.4. MATERIALES DE LABORATORIO

- ✓ Probetas de 100 ml.
- ✓ Beaker de 150ml.
- ✓ Morteros de porcelana.
- ✓ Tubos de ensayo.
- ✓ Espátula.

- ✓ Tubos Eppendorf.
- ✓ Gradilla para tubos de ensayo.
- ✓ Baguetas.
- ✓ Pizetas.
- ✓ Soporte universal.
- ✓ Pinzas.
- ✓ Placas de Silica gel.

2.5. MATERIAL ANEXO

- ✓ Jeringas de 1 mL, 3mL, 5mL.
- ✓ Aguja N°18.
- ✓ Sonda orogástrica.
- ✓ Hilos.
- ✓ Bisturí.
- ✓ Frascos ámbar.
- ✓ Jaulas metálicas.
- ✓ Guantes quirúrgicos.
- ✓ Papel filtro.
- ✓ Algodón.
- ✓ Barbijos.
- ✓ Frascos.
- ✓ Lápiz marcador.
- ✓ Capilares.
- ✓ Ollas de metal.
- ✓ Papel kraft.
- ✓ Papel aluminio.
- ✓ Regla.
- ✓ Plumón indeleble.
- ✓ Cúter.

2.6. TRATAMIENTOS Y FÁRMACOS

- ✓ Metformina 850mg (Laboratorio MEDIFARMA)
- ✓ Extracto de hojas de *Moringa oleífera Lam.*
- ✓ Agua destilada

2.7. REACTIVOS DE LABORATORIO

- ✓ Agua destilada.
- ✓ Alcohol 96°Q.P.
- ✓ Acetato de etilo Q.P.
- ✓ Eter etílico.
- ✓ Ácido fórmico.
- ✓ Ácido sulfúrico concentrado.
- ✓ Cloroformo.
- ✓ Hexano.
- ✓ Metanol.
- ✓ Tolueno.
- ✓ Reactivo de Dragendorff.
- ✓ Cloruro férrico 3%.
- ✓ Estreptozotocina.
- ✓ Formol 10%

3. MÉTODOS

3.1. TRATAMIENTO DE LA UNIDAD VEGETAL

3.1.1. SELECCIÓN Y RECOLECCIÓN

La riqueza de principios activos de una muestra vegetal, es un sistema complejo en el que se puede encontrar múltiples compuestos de mayor o menor relevancia farmacológica. Los factores que influyen y afectan estos principios activos como son el calor, la luz, humedad y microorganismos, por ello es preciso la correcta obtención, conservación, desecación (para evitar la alteración en su composición fitoquímica), molienda y concentración de los principios activos.^{55, 56}

Las hojas de Moringa fueron recolectadas en el departamento de Arequipa (El Pedregal) en éste lugar la planta tiene gran acogida y está siendo utilizada en la medicina tradicional los últimos años, estas fueron recogidas en su hábitat, de forma manual y en horas de la mañana, tomando únicamente las hojas de la planta el 21 de Abril del 2018 en el centro poblado Los Pioneros a una temperatura media de 25-27°C.⁵⁶

Se tuvo cuidado de escoger las hojas verdosas, eliminándose hojas en mal estado, luego se procedió a cortar de la base de cada hoja de la planta, las cuales fueron recogidas y envueltas en papel kraft a fin de evitar la contaminación de las hojas, se recolecto 3.5 Kg de hojas de Moringa, como se aprecia en la figura N°10 y N°11.



FIGURA N° 10: Árbol de Moringa cultivado en El Pedregal-Arequipa.



FIGURA N° 11: Recolección y selección de las hojas de Moringa del árbol.

3.1.2. PREPARACIÓN DE *Moringa oleífera* Lam “Moringa”

Para asegurar la identidad de la muestra vegetal, un ejemplar del espécimen vegetal se llevó al herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas del Departamento de Biología, *Herbarium Arequipense* (HUSA) para su correcta identificación taxonómica y tipificación. Ver ANEXO N° 01.

La hojas de Moringa recolectadas se llevaron al laboratorio de Farmacognosia de las instalaciones de la Universidad Católica de Santa María para su preparación y uso posterior, seguidamente se procedió a lavar las hojas cuidadosamente sumergiendolas en agua destilada a fin de eliminar sustancias extrañas, se las colocó en papel kraft como se muestra en la figura N°12.



FIGURA N° 12: Tallos y hojas de Moringa lavados

Posteriormente fueron secados en estufa de aire caliente a una temperatura de 38 ± 2 °C, por un periodo de 48 horas para obtener un secado uniforme.



FIGURA N° 13: Hojas de Moringa secadas a estufa.

Finalmente se pulverizó en un mortero, el producto se pesó y almacenó en una bolsa herméticamente sellada y envuelta en papel kraft para evitar alguna alteración por la luz, y contaminantes, hasta ser utilizadas para la extracción.



FIGURA N° 14: Proceso de pulverización de hojas de Moringa.

3.2. MÉTODO DE OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE *Moringa oleífera* Lam. CON DIFERENTES SOLVENTES

3.2.1. MÉTODO DE EXTRACCIÓN CONTINUA: EQUIPO DE SOXHLET

- **Fundamento:**

El método de Soxhlet se fundamenta en la extracción exhaustiva y por agotamiento de sustancias activas de la planta usando sustancias volátiles.⁵⁷

En esta extracción sólido – líquido, se siguen las siguientes etapas: primero se coloca el solvente en un balón, este alcanza una temperatura propicia para su evaporización hasta llegar a un condensador a reflujo, el condensado cae sobre el cartucho poroso que contiene la muestra, se va depositando el solvente hasta alcanzar cierto nivel cubriendo el cartucho hasta un punto en que se produce el reflujo que vuelve el solvente con el material extraído al balón, el proceso se repite automáticamente las veces necesarias para que la muestra quede agotada.⁵⁷

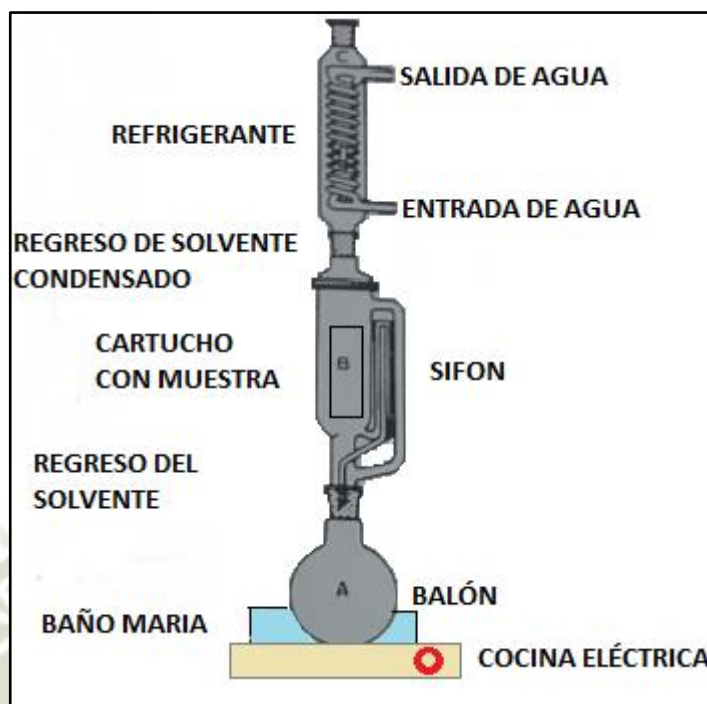


FIGURA N° 15: Equipo de Extracción por Soxhlet⁸⁷

- **Procedimiento**

En un cartucho de papel filtro se colocó 10 gramos de hojas de Moringa previamente pulverizadas, seguidamente fue colocado al Soxhlet. En el balón de destilación se añadió 150 ml de solvente, utilizando para cada extracción acetato de etilo, éter etílico o etanol 96°, se armó el equipo de Soxhlet sobre baño María y se puso en marcha el sistema controlando la temperatura hasta antes de llegar a ebullición del solvente. El solvente en estado gaseoso ascendió por el tubo lateral, llegó hasta el refrigerante donde se condensó y regresó hasta ponerse en contacto con la muestra contenida en el cartucho de papel filtro, repitiendo el proceso hasta llegar al punto más alto del sifón, donde el solvente con las sustancias activas extraídas regresó al balón, para repetir el proceso hasta agotamiento de la muestra, donde se finaliza la extracción. Finalmente el resultado se almacenó en un frasco ámbar herméticamente cerrado, para evitar cualquier tipo de contaminación o cualquier alteración por la luz.



FIGURA N° 16: Extracción mediante Soxhlet

- **Ventajas de la extracción soxhlet:**
 - Es una metodología muy sencilla con instrumentación simple, barata y gran capacidad de recuperación.
 - No se requiere filtración posterior.
 - El disolvente y la muestra están en contacto íntimo y repetido. De manera que se mejora muchísimo lo que ayuda a desplazar el equilibrio de transferencia y en la extracción siempre se emplea un disolvente limpio. El disolvente proviene de una condensación luego es líquido y está caliente. Favorece la solubilidad del analito.⁵⁸

- **Desventajas de la extracción soxhlet**
 - El proceso es lento e imposible de acelerar.
 - No aconsejable a analitos termolábiles, que se descompongan por acción del calor.⁵⁸

Para evaporar el solvente, se procedió a llevarlo al equipo de rotavapor en donde se utilizó una temperatura de 50°C y presión reducida, hasta llegar a un volumen de solvente similar al de inicio, el proceso se llevó a cabo como se observa en la figura N° 17.



FIGURA N° 17: Equipo de rotavapor

3.3. RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS

3.3.1. MÉTODO GRAVIMÉTRICO

- **Fundamento:** Porcentaje de rendimiento de la extracción (%RE) se fundamenta en el método gravimétrico, basado en la determinación de la diferencia de peso al evaporar todo el solvente del extracto obtenido.
- **Procedimiento:**
El extracto obtenido contenido en un balón, previamente pesado, se llevó a rotavapor o baño María hasta su eliminación del solvente. Se pesa el extracto obtenido luego de la eliminación del solvente y a por diferencia de pesadas se obtiene el peso de extracto concentrado, para determinar el rendimiento de los extractos se calcula de la siguiente manera:⁵⁹

$$\% \text{ de Rendimiento} = \frac{\text{Peso del Extracto concentrado}}{\text{Peso de la Muestra}} \times 100$$

3.4. ANÁLISIS FITOQUÍMICO

La extracción de los principios activos de las plantas, utilizan diferentes técnicas, la mas común es la extracción sólido – líquido cuya finalidad es la separación de los componentes fitoquímicos de los tejidos vegetales por acción de un solvente.⁶⁰

La fitoquímica estudia a los componentes químicos de las plantas, utilizando métodos físicos el mas empleado es la cromatografía en capa fina, donde podemos distinguir los principales tipos de metabolitos como son : alcaloides, flavonoides, taninos entre otros.⁶⁰

3.4.1. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

CCF es un método físico de separación de diversos componentes de una muestra problema, el cual permite separar los componentes químicos empleando una fase móvil y una fase estacionaria. Para el revelado e identificación de estos componentes, se utilizan métodos físicos, como la luz UV, o métodos químicos, como reactivos de identificación.⁶¹

a) Ventajas de CCF:

- ✓ Produce una dispersión de manchas y colas en proporciones mucho menores que la cromatografía sobre papel, además las manchas individuales tienen mayor poder resolutivo, lo que hace que las determinaciones sean fáciles.
- ✓ Es más rápida, por término medio es de unas treinta veces mayor que en papel.
- ✓ Los reactivos fuertes pueden usarse con fines de identificación, lo que no es posible en la de papel.

✓ Las placas de CCF se pueden calentar a temperaturas más altas sin ningún daño.^{62,63}

b) **Adsorbentes:** El tamaño de las partículas, polaridad, homogeneidad y pureza son características importante a tener en cuenta para la elección de un adsorbente, además debe ser inerte con las sustancias a analizar y no actuar como catalizador en reacciones de descomposición. Los dos adsorbentes más comúnmente utilizados son la gel de sílice (SiO_2) y la alúmina (Al_2O_3), ambas de carácter polar.⁶⁴ El gel de sílice es uno de los más utilizados se utiliza para separar sustancias más polares (alcoholes, aminas, ácidos carboxílicos), es débilmente ácido y puede llevar incorporado un agente aglomerante, como el yeso.⁶⁵

c) **Sistemas de elección de eluyente:** Se realiza de forma empírica evaluando la polaridad del componente. El orden de elución de un compuesto se incrementa al aumentar la polaridad de la fase móvil o eluyente. Este puede ser un disolvente único o dos miscibles de distinta polaridad.^{64,66}

Principales eluyentes más comúnmente empleados en orden creciente de polaridad:

Éter dietílico < Hexano < tetraclorometano < cloroformo < diclorometano < acetato de etilo < acetona < 2-propanol < metanol < agua.

El eluyente idóneo para cada caso ha de encontrarse por "el método del ensayo y del error" y esto se evidencia en el desarrollo del estudio.^{64,66}

d) **Factor de Referencia: R_f**

Es el resultado de la distancia recorrida por el compuesto sobre la distancia recorrida por el eluyente, tiene un valor constante para cada

compuesto siempre y cuando se reproduzcan las mismas condiciones como son adsorbente, disolvente, temperatura, etc. El máximo valor de R_f que se puede alcanzar es de 1, así, mientras más avance un componente con la fase móvil, más alto será su valor de R_f .⁶¹

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el compuesto (X)}}{\text{Distancia recorrida por el eluyente (Y)}}$$

En el desarrollo de este trabajo los tres extractos obtenidos por diferentes solventes, fueron sometidos a los mismos eluyentes (fase móvil).

3.4.2. METODO CROMATOGRÁFICO

- a) **Fase estacionaria:** Se empleó silica gel contenida en placas de aluminio, estas fueron cortadas cuidadosamente en dimensiones de 10cm por 5cm, dejando 1cm de distancia en relación al extremo superior e inferior. A este nivel se trazó una línea de sembrado, por el extremo inferior. Se realizó capilares finos para proceder al sembrado, con una aplicación de 15 siembras por cada tipo de extracto, dejando una separación entre sí de 0.5cm entre cada uno, a fin de evitar la mezcla de estos. Se dejó secar la placa a temperatura ambiente, para después ser colocada en la cuba cromatografica conteniendo la fase móvil.
- b) **Fase móvil:** Dependió del metabolito a estudiar, esta constó de una mezcla de diferentes solventes, en los que variaban las proporciones, así como la polaridad, además el volumen final aproximadamente 5ml, no sobrepasó la línea de sembrado de la placa de silica gel. En la tabla N°3 se muestran los eluyentes utilizados como fases móviles para la determinación de los diferentes grupos de metabolitos secundarios.⁶⁷

Se depositó la fase móvil preparada en la cuba cromatográfica para poder saturar el medio.

TABLA N° 2: Fase móvil empleada para la identificación de metabolitos

METABOLITOS	COMPOSICIÓN DE LA FASE MOVIL	PROPORCIÓN
Corrida general	n-hexano:acetona	8:2
Flavonoides	n-butanol:ácido acético:agua	4:1:5
Taninos	Metanol:agua	70:30
Alcaloides	Cloroformo:etanol	9:1

c) **Desarrollo cromatográfico:** Con el empleo de una pinza se colocó la placa cromatografica, una vez sembrada y secada, en la cuba cromatográfica que contenia la fase móvil adecuada. Se esperó el ascenso de la fase móvil a través de la placa cromatografica hasta la línea superior sin sobrepasar el extremo superior de esta, figura N°18, finalmente se retiró la placa y se dejó secar a temperatura ambiente, el resultado final con el desarrollo de bandas de diferentes colores se aprecia en la figura N°19.

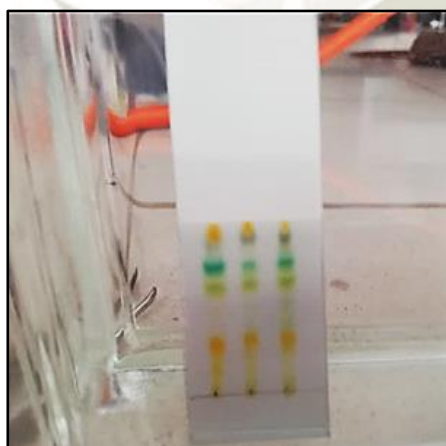


FIGURA N° 18: Procedimiento de cromatografía en capa fina

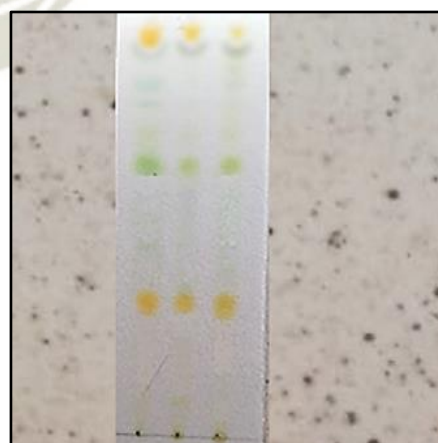


FIGURA N° 19: Placa de sílica gel con analitos separados

3.5. IDENTIFICACIÓN DE SAPONINAS

Las saponinas se pueden valorar por métodos físicos o biológicos, en este trabajo se empleó el Índice de Espuma o Índice Afrosimétrico.

3.5.1. PRUEBA DE ESPUMA

Fundamentada en la propiedad físico-química que presentan las soluciones acuosas de saponinas, de disminuir la tensión superficial de los líquidos acuosos, provocando abundante espuma por agitación.⁶⁸

- **Detección:** La formación de espuma persistente por 30 minutos indica la presencia de saponinas.⁶⁸

3.6. MÉTODOS BIOLÓGICOS

3.6.1. ETAPAS DE AMBIENTACIÓN Y ALIMENTACIÓN DE LOS ANIMALES.

Los animales de experimentación aparentemente sanos fueron sometidos a un periodo de estandarización por 7 días previos a la realización del experimento, teniendo en cuenta las condiciones ambientales y su alimentación que consistió en una mezcla de maíz, trigo, cebada y agua. Luego se procedió a la formación de los grupos experimentales los cuales fueron distribuidos en forma completamente al azar y codificados de igual manera, marcándolas con fucsina en diferentes segmentos del cuerpo, es así que fueron distribuidas en jaulas acondicionadas como se muestra en la figura N°20.

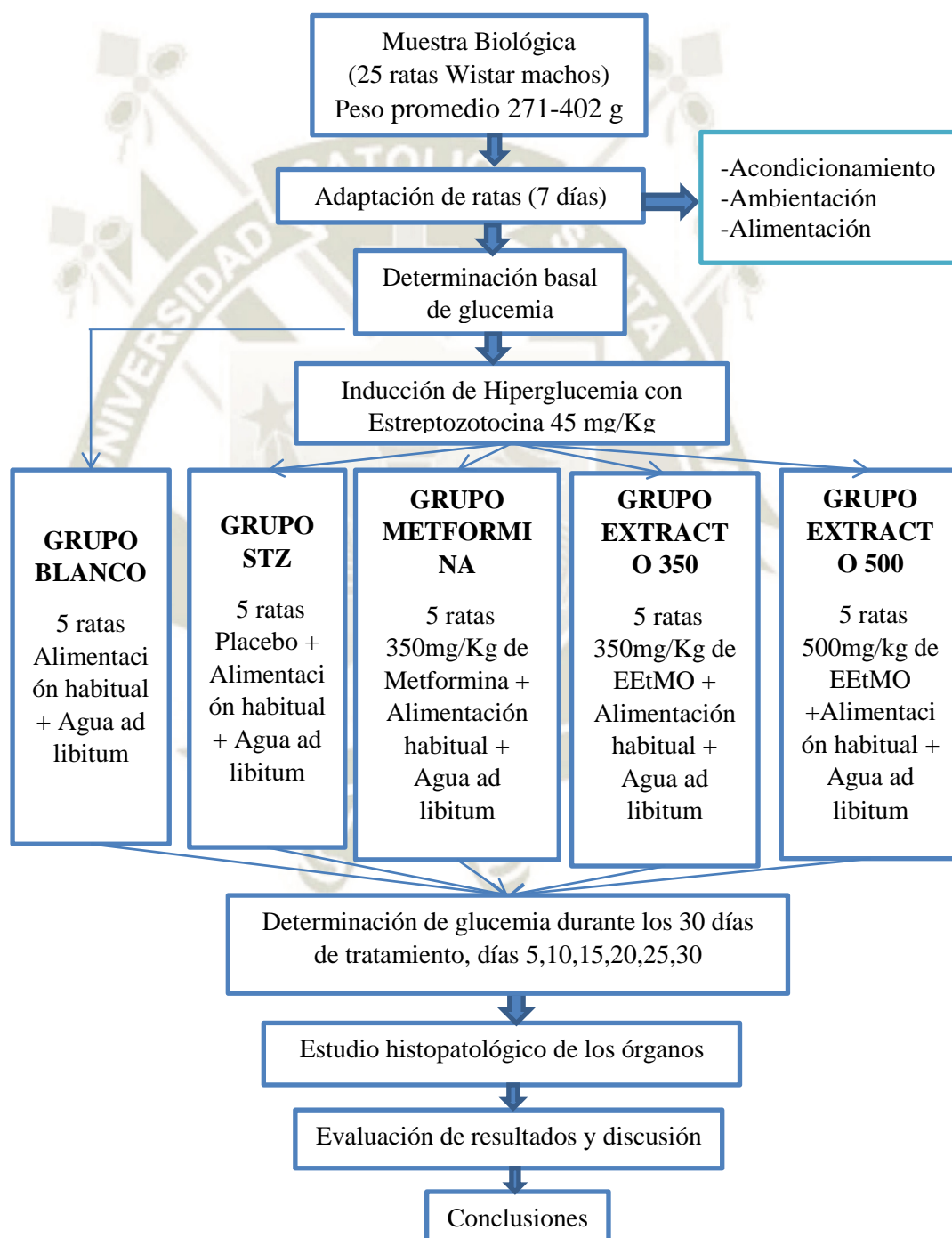


FIGURA N° 20: Distribución y estandarización de animales de experimentación

3.6.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizó un diseño completamente al azar, cuyos unidades experimentales, tratamientos, y evaluaciones se muestran en el siguiente esquema experimental, figura N°21.

FIGURA N° 21: Esquema de diseño experimental



3.6.3. PRODUCCIÓN EXPERIMENTAL DE HIPERGLUCEMIA POR STZ

La hiperglucemia experimental se produjo mediante la inyección intraperitoneal de STZ a una dosis de 45 mg/Kg de peso⁶⁹, tal como se observa en la figura N° 22. La STZ se disolvió en cloruro de sodio al 0.9% inmediatamente antes de su uso, se realizaron los cálculos previos para la disolución y se tuvo una relación de 2 ml/Kg de peso para la administración, ver ANEXO N° 03.



FIGURA N° 22: Administración de la Solución de STZ por vía IP.

3.6.4. ELABORACIÓN Y DOSIFICACIÓN DE TRATAMIENTOS

Una vez obtenido el extracto etanólico de hojas de Moringa, se procedió a la pesada del extracto, considerando la presencia del 20% de agua ya que se trata de un extracto blando de hojas, y su disolución en un volumen determinado de agua destilada evidenciando una rápida solubilidad. Para el tratamiento de Metformina se trituró la tableta en un mortero de porcelana, se pesó y se procedió a la disolución en agua destilada, mostrando una buena solubilidad. Los cálculos desarrollados se muestran en el ANEXO N° 03. El tratamiento placebo constó de agua destilada administrando 2ml a cada animal de experimentación del grupo STZ.

Se pesó a cada animal a fin de determinar las dosis de los diferentes tratamientos, figura N°23, y posteriormente la administración de estos por vía oral a través de una sonda orogastrática como se observa en la figura N°24.



FIGURA N° 23: Pesada de los animales



FIGURA N° 24: Administración de los tratamientos

3.6.5. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA SANGUÍNEA

Las muestras de sangre se recolectaron por punción en el ápice de las colas hasta obtener una gota homogénea y el contacto por el extremo libre de la tira reactiva del glucómetro, figura N° 25. Los valores obtenidos del glucómetro fueron expresados en mg/dL. La ventaja de

esta forma de toma de muestra es que se reduce al mínimo total de dolor, sufrimiento y trastorno que puedan sufrir los animales.



FIGURA N° 25: Obtención de la muestra de sangre

3.6.6. MEDICIÓN DE LA GLUCEMIA

La medición de los niveles de glucosa en los animales de experimentación se realizaron con un glucómetro digital AccuChek® Performa y tiras reactivas Accu-Chek Performa de los laboratorios Roche, el cual está diseñado para ayudar a controlar la diabetes de una manera rápida, precisa y sencilla, figura N° 26.



FIGURA N° 26: Glucómetro Accu-Chek® Performa

Se tomaron las muestras de sangre por las mañanas, durante los días 5, 10,15,20,25,30 de tratamiento, observado visualmente en la pantalla la lectura correspondiente al valor de la glucosa.

Los valores normales de glucosa en sangre en ratas esta comprendido entre un rango de 50-135 mg/dL.⁷⁰

✓ FUNDAMENTO:

Basado en una reacción física y bioquímica, enzima sustrato, debido a que las tiras reactivas contienen una enzima que puede tratarse de la glucosa oxidasa o la glucosa deshidrogenasa, según la enzima cataliza la glucosa contenida en una muestra de sangre, y genera un cambio de color que varía según la concentración: entre más oscuro es el color, mayor será la concentración de glucosa.⁷¹

Estudios independientes confirman la precisión del medidor Nuevo Accu-Chek Performa segun las nuevas normas ISO 15197:2013.⁷²

✓ PROCEDIMIENTO:

Primero se realizó la higiene de las manos, se preparó el dispositivo de punción, se insertó la tira reactiva en el medidor según la dirección de las flechas, el medidor se encendió y emitió una señal sonora. Cuando el símbolo de la gota de sangre parpadeó, se efectuó la punción en el extremo de la cola del animal. La gota de sangre se puso en contacto con el extremo de la tira reactiva hasta que el medidor emitio una señal de que la sangre fue suficiente.

El resultado de la medición apareció en la pantalla. Si la medición fue realizada con éxito, el medidor se apagó automáticamente 5 segundos después de retirar la tira reactiva.⁷²

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron ordenados en una matriz de sistematización, para después ser procesados mediante el software SPSS 20.0 para lo cual se hizo uso de las siguientes pruebas estadísticas:

3.7.1. Análisis de varianza (ANOVA)

Las comparaciones de los niveles séricos de glucosa se realizaron mediante la prueba de comparación estadística de ANOVA. Este análisis se utiliza para analizar si existe o no diferencia estadística significativa en los resultados de los diferentes grupos experimentales, considerando un nivel de confianza del 95%.⁷³

3.7.2. PRUEBA TUKEY

La Prueba de TUKEY nos permite discriminar las posibles comparaciones del tratamiento entre las medias de los diferentes grupos experimentales, evalúa la hipótesis y determina el tratamiento de mayor efectividad en los niveles séricos de glucosa. Las diferencias estadísticas se determinaron con los siguientes niveles de significancia: $p < 0.01$, diferencia altamente significativa; $p < 0.05$ diferencia significativa; $p > 0.05$ diferencia no significativa.⁷³

3.8. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

Al finalizar el experimento (30 días) se sacrificaron a los animales por el método de dislocación cervical, teniendo en consideración los aspectos éticos para el manejo de animales de experimentación según lo estipulado en la Directiva Europea 2010/63/EU para la protección de animales de laboratorio, que permitan disminuir al máximo el sufrimiento de los animales.⁷⁴

3.8.1. ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO DE PÁNCREAS E HÍGADO

El procedimiento de lectura de las láminas a estudiar se realizaron en el Laboratorio de Anatomía Patológica, del Departamento de Microbiología y Patología de la Facultad de Medicina de la UNSA.

✓ Procedimiento:

Se sacrificaron a las ratas en estudio por dislocación cervical, el órgano pancreático e hígado fueron extraídos mediante corte longitudinal del abdomen y diseccionados con bisturí N° 11, posteriormente el páncreas e

hígado se lavaron con suero fisiológico 0.9% y fueron introducidos en sus respectivos recipientes con formol al 10% por tres días. Los cortes fueron hechos a ocho micras teñidas mediante coloración diferencial hematoxilina - eosina (H&E), el protocolo esta detallado a continuación.^{75,76}

Las muestras se dejaron en la estufa a 60°C por diez minutos (desparafinación), se sumergió las muestras en Xilol para eliminar excesos de parafina (final desparafinación), se pasó por una serie de alcoholes en orden (100°, 96° y 70°) por dos minutos, luego con agua destilada (hidratación)

La etapa de tinción consistió en sumergir por tres minutos en Hematoxilina, luego se lavó en agua destilada por diez minutos para eliminar el exceso de colorante.

La muestra se pasó rápidamente con alcohol clorhídrico varias veces, para eliminar el exceso de coloración en la muestra (diferenciación), se lavó con agua por un par minutos, se sumergió la muestra en Eosina durante tres a cinco minutos y se da un baño rápido con agua. Se pasó por una serie de alcoholes en orden creciente 70°, 96°, 100°, de tres a cinco minutos. (deshidratación), y se acabó sumergiendo las muestras en xilol durante unos cinco minutos, se montó de manera habitual, como se muestra en la figura N°27.⁷⁵

Las muestras histológicas fueron observadas en el laboratorio y microscopía, utilizando el microscopio óptico MOTIC, modelo BA210 SERIES, registrando la información mediante fotografías a diferente aumentos de: 4X, 10X y 40X.

La lectura respectiva de las muestras fue con coordinación de la Medico Patóloga docente de la sección de Patología, el Departamento Académico nos proporciono una Constancia. ANEXO N° 10.



FIGURA N° 27: Laminillas terminadas tinción Hematoxilina – eosina.



CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS BLANDOS DE HOJAS DE MORINGA:

La obtención de los extractos se realizó por el método de Soxhlet, hasta agotamiento de la muestra, alcanzando un promedio de 13 a 15 ciclos con cualquiera de los solventes. El resultado fue un extracto blando, naturaleza propia de los extractos de hojas, de consistencia semisólida, para el caso de los tres solventes utilizados, en la figura N° 28 se muestra el extracto etanólico.

1.1. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS

TABLA N° 3: Características organolépticas de los extractos obtenidos

	EXTRACTO		
	ETANÓLICO	ACETATO DE ETILO	ETER ETÍLICO
Color	Verde oscuro	Verde	Verde oscuro
Olor	Sui géneris	Sui géneris	Sui géneris
Aspecto	Pastoso	Pastoso	Pastoso
Consistencia	Blanda	Blanda	Blanda

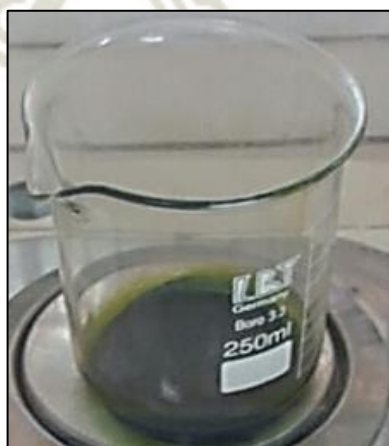


FIGURA N° 28: Extracto etanólico blando de hojas de Moringa.

Es importante considerar las variaciones en cuanto a las condiciones de cultivo, de crecimiento y cosecha de la planta, los métodos en el procesamiento de la hoja los cuales se asemejan al uso tradicional de esta y considerar todos los aspectos que puedan interferir en la efectividad del tratamiento y en la potencial propiedad hipoglucemiante de nuestra planta.

2. RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS BLANDOS

Se evaluó %RE después de obtenidos los extractos blando de hojas de Moringa con diferentes solventes ya mencionados, ver el ANEXO N° 02 donde se detalla el peso de las extracciones.

TABLA N° 4: Promedio de los rendimientos de los extractos

EXTRACTOS BLANDOS	Peso promedio(g) extracciones por triplicado	% de Rendimiento
Etanólico	3.38	33.8
Acetato de Etilo	0.98	9.8
Éter Etilico	1.99	19.9

En la TABLA N°4 se puede observar el peso promedio resultante de tres extracciones realizadas bajo las mismas condiciones de desarrollo experimental, considerando las diferencias en sus características físicas como la temperatura, ya que en el extracto éter etílico se conservó una temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 2$, mientras que en los extractos de etanol 96° y acetato de etilo se conservó una temperatura de $70^{\circ}\text{C} \pm 2$. Se observa que el mejor resultado pertenece al extracto etanólico ya que se obtuvo una mayor cantidad de extracto resultante y por lo tanto un mayor rendimiento.

En la Fig. N°29 se evidencia a través del gráfico de barras el %RE de cada uno de los extractos, donde se percibe que el extracto de mayor rendimiento es el etanólico (33.8 %), esto se debe a la polaridad que tiene el etanol, siendo capaz de formar puentes de hidrógeno. El extracto de Acetato de etilo tuvo un rendimiento de (9.8 %)

y el extracto de éter etílico (19.9 %), esto se debe a la a que el acetato de etilo tiene una mediana polaridad y el éter Etílico tiene muy baja polaridad.

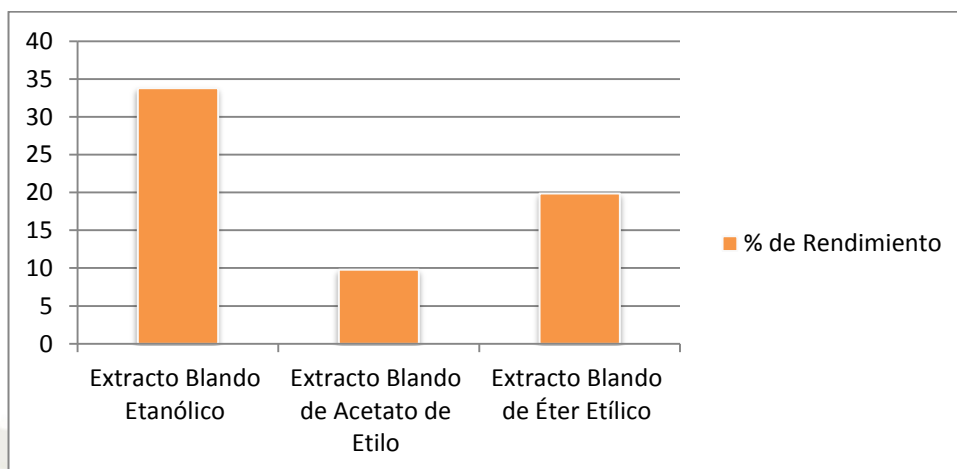


FIGURA N° 29: Porcentaje de rendimiento de los extractos de Moringa con diferentes solventes.

La obtención de los extractos se realizó por el método de Soxhlet, hasta agotamiento de la muestra, donde se percibe que el extracto de mayor rendimiento es el etanólico, el acetato de etilo tiene una mediana polaridad y el éter Etílico tiene muy baja polaridad, considerando esto como factor influyente en los rendimientos de los extractos. Tal como lo muestra el estudio de Caro Palomino, 2010 “Estudio del efecto hipoglicemiente del extracto metanólico de *Otholobium pubescens* (poiret) grimes “culén” en ratas Wistar. arequipa – 2010”, trabajó con tres diferentes solventes: metanol, acetato de etilo y hexano, obteniendo tres extractos que presentaron efecto hipoglicemiente, dando mejores resultados y mayor rendimiento el extracto de metanol con 4.89%, a diferencia de el extracto de acetato de etilo y hexánico con los que obtuvo 2.21% y 0.81% repectivamente.¹⁹

3. ANÁLISIS FITOQUÍMICO

3.1. IDENTIFICACIÓN DE GRUPOS DE METABOLITOS

SECUNDARIOS POR CCF:

Se realizó la identificación cromatográfica de grupos de metabolitos secundarios de los extractos obtenidos con cada solvente. Se pudo diferenciar con ayuda de la

fase móvil específica para cada grupo de metabolitos secundarios, el desarrollo de bandas características, y además se pudo calcular el RF para cada banda desarrollada.

Se realizó una corrida general en donde se diferenciaron múltiples bandas de distinto color y distinta distancia recorrida, seguidamente utilizando fases móviles adecuadas se procedió a la identificación de flavonoides, taninos, y alcaloides.

3.1.1. CORRIDA GENERAL

Para el desarrollo de esta corrida se empleó la fase móvil n-hexano:acetona (8:2) en donde se evidenciaron bandas a simple vista, siendo positiva para los tres extractos, y también al ser expuestas a luz UV en una longitud de onda de 365 nm. En el cromatofolio de identificación general del extracto etanólico se observó a simple vista el desarrollo de bandas de color amarillo, azul oscuro, naranja, y verde en orden ascendente, las cuales presentan un Rf de 0.44, 0.52, 0.74, 0.85, 0.87; los resultados obtenidos podrían tratarse de grupos de metabolitos secundarios como flavonoides, taninos y alcaloides, tal como se muestra en la figura N°30.

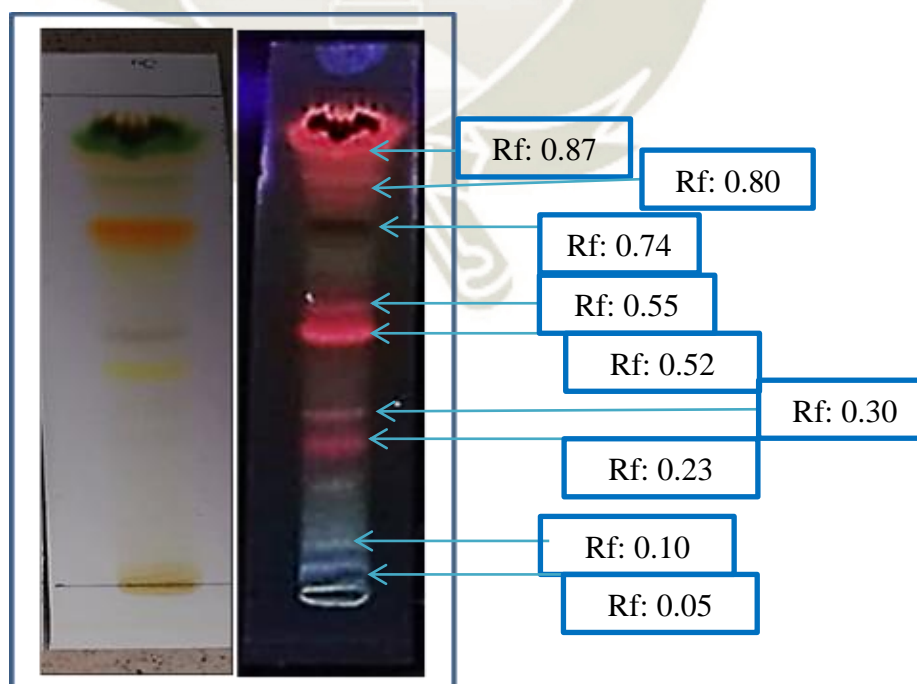


FIGURA N° 30: Cromatofolio del extracto etanólico

El cromatofolio de la identificación general del extracto acetato de etilo observado a simple vista muestra el desarrollo de bandas de color amarillo, verde oscuro y naranja en orden ascendente, las cuales presentan un Rf de 0.47, 0.62, 0.73; podría tratarse de grupos de metabolitos secundarios como flavonoides y alcaloides, estos resultados se muestran en la figura N°31.

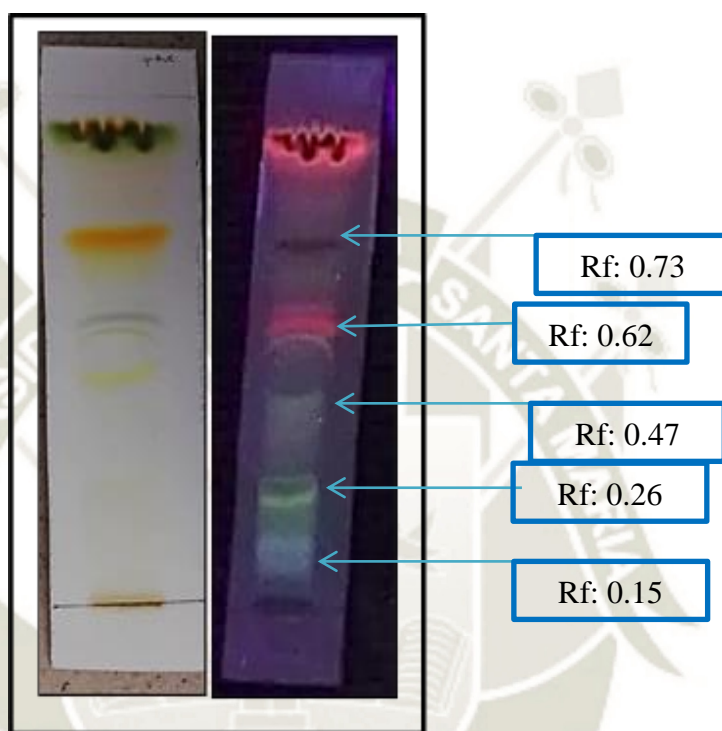


FIGURA N° 31: Cromatofolio del extracto acetato de etilo

El cromatofolio de la identificación general del extracto éter etílico observado a simple vista muestra el desarrollo de bandas de color verde claro, amarillo, naranja y las cuales presentan un Rf de 0.41, 0.48, 0.68; podría tratarse de grupos de metabolitos secundarios como flavonoides y alcaloides; estos resultados son visibles en la figura N°32.

La corrida general de los diferentes extractos hace notar la presencia de diferentes bandas que indican diferentes grupos de metabolitos secundarios y se apreció un mayor número de bandas en el extracto etanólico.

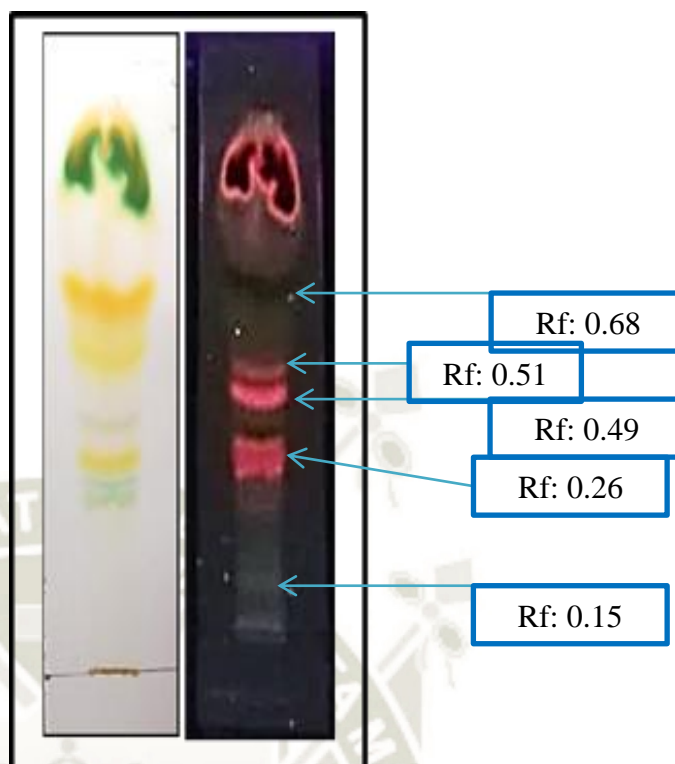


FIGURA N° 32: Cromatofolio del extracto éter etílico

3.1.2. IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES:

La fase móvil empleada fue n-butanol:ácido acético:agua (4:1:5)⁷⁷ la observación de bandas desarrolladas a simple vista fueron de color amarillo y amarillo intenso. El uso del revelador ácido sulfúrico concentrado, intensificó el color de las bandas y posteriormente se calculó los Rf del cromatofolio, la corrida correspondiente al extracto etanólico, ubicada en el extremo izquierdo obtuvo valores de 0.85 para la mancha más intensa y 0.69 para la mancha mas ténue, respecto al extracto de acetato de etilo ubicado en el centro obtuvo un valor de 0.77 y respecto al extracto éter etílico no se mostró banda que pudo deberse a la polaridad de este solvente al presentar una baja polaridad, estos resultados se pueden evidenciar en la figura N°33.

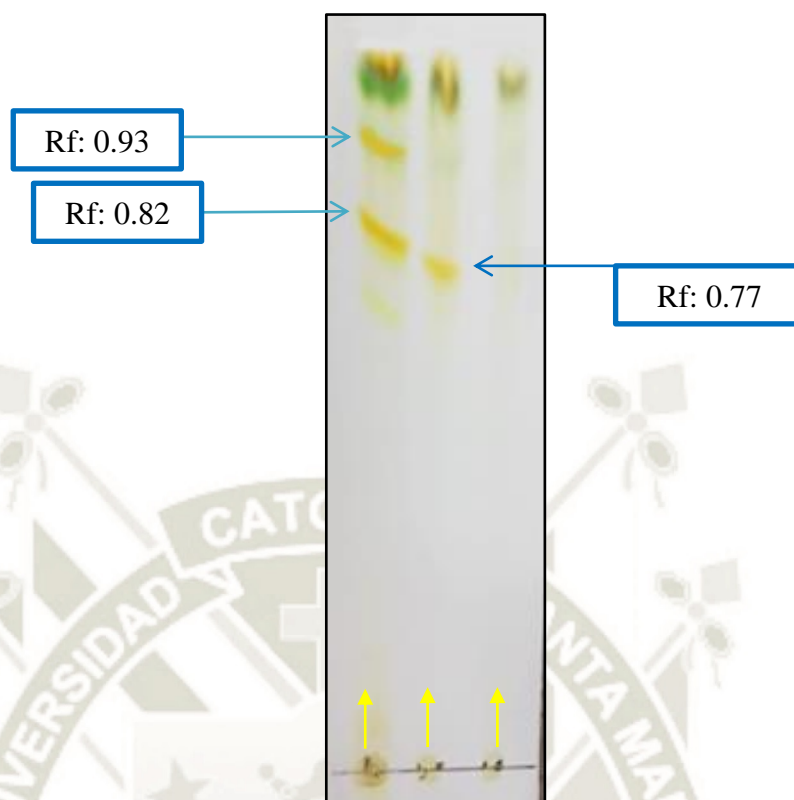


FIGURA N° 33: Cromatofolio de flavonoides de los tres extractos

Los flavonoides presentes en el extracto de hojas podrían tratarse de quercetina y el kaempferol tal como lo muestra el estudio de Soni y Goswami titulado “Identification, Isolation and Estimation of Flavonoids and Effect of Growth Regulators and Salts on Flavonoids in *Aegle marmelos* and *Moringa oleífera* in vitro” en donde los extractos fueron obtenidos por el método de Soxhlet y para la identificación de flavonoides se utilizó la fase móvil antes mencionada resultando los mismos valores de Rf para quercetina y kaempferol.⁷⁷

Cabe mencionar el estudio de Devaraj, Krishna y Viswanatha, titulado “Simultaneous determination of quercetin, rutin y kaempferol in the leaf extracts of *Moringa oleífera* Lam. and *Raphinus sativus* by liquid chromatography-tandem mass spectrometry” que indican la presencia de rutina, quercetina y kaempferol tanto en *Moringa oleífera* Lam. y *Raphinus sativus* trabajaron mediante una técnica de maceración utilizando etanol.⁷⁸

La presencia de estos flavonoides podrían atribuir el efecto hipoglucemiante atribuido a las hojas de *Moringa oleífera* Lam. tal como lo muestra la revisión de información científica de Velásquez, Peón, Zepeda y Jiménez, titulado “*Moringa (Moringa oleífera Lam.): potential uses in agricultura, industry and medicine.*”⁸

3.1.3. IDENTIFICACIÓN DE TANINOS:

La fase móvil empleada fue metanol:agua (70:30) y el revelador fue Cloruro Férrico al 1%. El cromatofolio de identificación de taninos mostró dos bandas de color azul que se evidenciaron solo en el extracto etanólico en donde los valores de Rf fueron de 0.33 y 0.49, esto se muestra en la figura N°34.

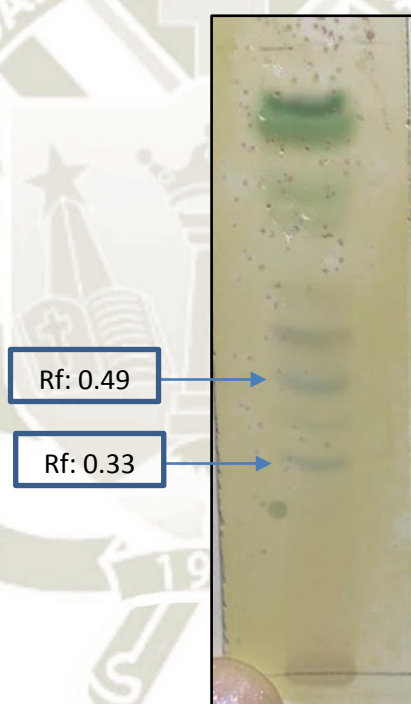


FIGURA N° 34: Cromatofolio de taninos de extracto etanólico

Respecto a los extractos acetato de etilo y éter etílico no se evidenciaron bandas tal como lo muestra el extracto etanólico, esto puede ser debido a la baja capacidad de solubilidad de los taninos en solventes de baja polaridad.

3.1.4. IDENTIFICACIÓN DE ALCALOIDES:

La fase móvil empleada fue cloroformo:etanol (9:1), se usó como revelador el reactivo de Dragendorff que se preparo inmediatamente antes de su uso. En el

cromatofolio de identificación de alcaloides se desarrollaron bandas de color naranja intenso lo cual indica la presencia de alcaloides en los tres tipos de extractos se procedió al cálculo de los Rf, correspondiente al extracto etanólico ubicado en el extremo izquierdo se observó una banda con valor de Rf 0.51; respecto al extracto de acetato de etilo ubicado en la parte central se visualizaron una banda con valor de Rf fueron 0.41 y respecto al extracto éter etílico ubicado en el extremo derecho se visualizó una banda cuyo Rf calculado fue de 0.42, los resultados se visualizan en la figura N°35.

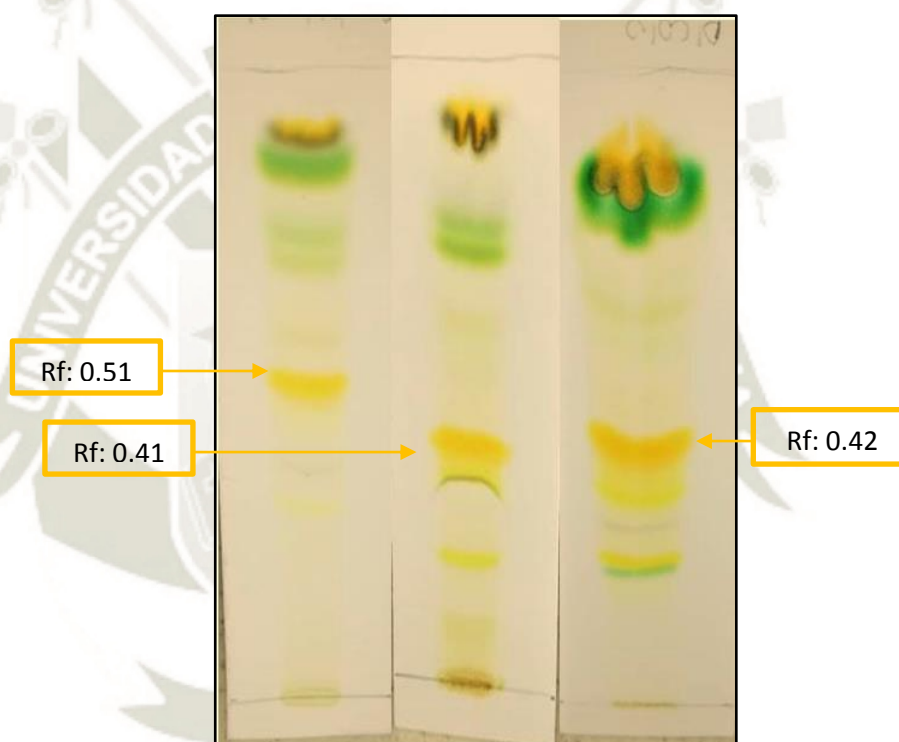


FIGURA N° 35: Cromatofolio de alcaloides de los tres extractos

4. IDENTIFICACIÓN DE SAPONINAS

Para el desarrollo de este ensayo se tomó 1ml de extracto etanólico, acetato de etilo y éter etílico en un tubo de ensayo en donde se completó con 10ml de agua, se agitó vigorosamente por 30 segundos y se dejó en reposo por 30 minutos.

Se observó la formación de una capa de espuma persistente y alta pasado el tiempo en el extracto etanólico, lo que evidencia que las hojas de moringa

presentan saponinas. En la figura N°36 se aprecian los tubos con los diferentes extractos en el lado izquierdo extracto etanólico, en el medio acetato de tilo y el lado derecho éter etílico.



FIGURA N° 36: Prueba de espuma.

5. ESTUDIO DEL EFECTO HIPOGLUCEMIANTE

La etapa de ambientación (7 días) y la alimentación estandarizada (maíz, trigo, cebada y agua) en ratas Wistar, fue con la finalidad de evitar errores experimentales. La STZ se disolvió con suero fisiológico, obteniéndose una solución, previo a esto se hicieron los cálculos respectivos para la dosis de cada animal, que fue determinado por su peso y por la vía a administrarse.

Se procedió a la administración de la solución de STZ por vía intraperitoneal. Cabe mencionar que no se tuvo problemas al momento de la disolución con el suero fisiológico, ya que es soluble. Una vez comprobada la hiperglucemia inducida en las ratas, después de 48 horas de administración de STZ (día 0), se continuó con la administración de los diferentes tratamientos: extractos de *Moringa oleífera* Lam “Moringa” por sonda orogástrica a dosis de 350 mg/Kg y 500 mg/Kg al grupo correspondiente una vez por la mañana durante 30 días hasta llegar al día 30 de tratamiento.

Empezado el tratamiento se midió la glucosa cada cinco días: día 5, día 10, día 15, día 20, día 25 y día 30, observándose que los grupos que recibieron el extracto de hojas de Moringa a una dosis de 500 mg/Kg mostraron una mejor respuesta en comparación a la dosis de 350 mg/Kg, y resultados similares a tratamiento de Metformina 350 mg/Kg. El peso fue monitoreado durante todo el desarrollo experimental. La pérdida de peso corporal y el aumento en el consumo de agua y comida en los animales enfermos, GRUPO STZ, que no recibió tratamiento y su niveles de glucosa aumentaron.

5.1. EVALUACIÓN DEL PESO

El monitoreo del peso de las ratas fue al empezar la investigación, después de aplicada la STZ (día 0) y a los días 5, 10, 15, 20, 25 y 30 de iniciado el tratamiento.

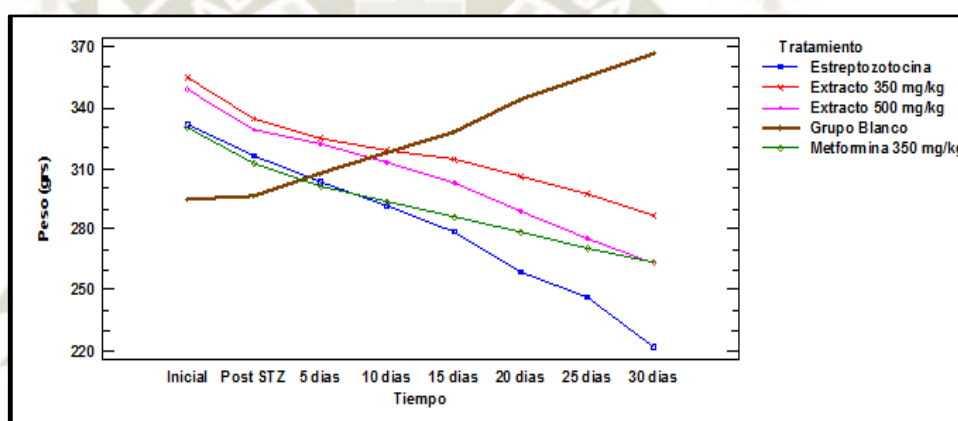
TABLA N°5: Evolución de los pesos (g) promedio de los diferentes grupos experimentales durante el tratamiento

GRUPOS	PESOS (g)							
	PESO INICIAL	POST STZ (DIA0)	TRATAMIENTO					
			DIA 5	DIA 10	DIA 15	DIA 20	DIA 25	DIA 30
Metformina 350 mg/Kg	330.0	312.6	301.2	293.6	286.0	278.6	270.4	263.8
Extracto 500 mg/Kg	349.2	329.0	322.0	313.2	302.6	288.6	275.4	263.0
Extracto 350 mg/Kg	354.8	334.4	324.6	319.0	314.4	305.8	297.6	286.8
STZ	332.0	316.4	303.4	291.4	278.6	259.0	246.7	221.3
Grupo blanco	294.6	296.4	307.6	317.6	328.2	344.0	355.4	366.4

La TABLA N°5 y FIGURA N°37 muestran resultados claros sobre el grupo blanco en donde los animales van ganando peso en relación al tiempo ya que no

recibieron STZ, el grupo tratado con Metformina después de producida la hiperglucemia (día 0) hasta los 30 días se observa una disminución de pesos en promedio de 15.61%; el extracto etanólico de hojas de Moringa a una dosis de 500 mg/Kg evidenció una disminución promedio de 20.0%; con el extracto etanólico de hojas de Moringa a una dosis de 350 mg/Kg se llega a un promedio de disminución de peso de 14.23%, mientras que el grupo STZ que no recibió tratamiento un promediode disminución de 30.0%.

FIGURA N°37: Evolución de los pesos promedio (g) de los diferentes grupos experimentales durante el tratamiento



De acuerdo a estos resultados se puede afirmar que el extracto etanólico de *Moringa oleífera Lam* a dosis de 350 mg/Kg y la Metformina evitan un descenso marcado en el peso, nos indica una recuperación de la hiperglucemia.

5.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES

Para el estudio estadístico de los resultados se realizó el ANOVA para indicar si existen diferencias significativas en los resultados y se usó la prueba de Tukey para ver las diferencias entre los diferentes grupos experimentales.

5.2.1. EVALUACIÓN GLUCOSA BASAL:

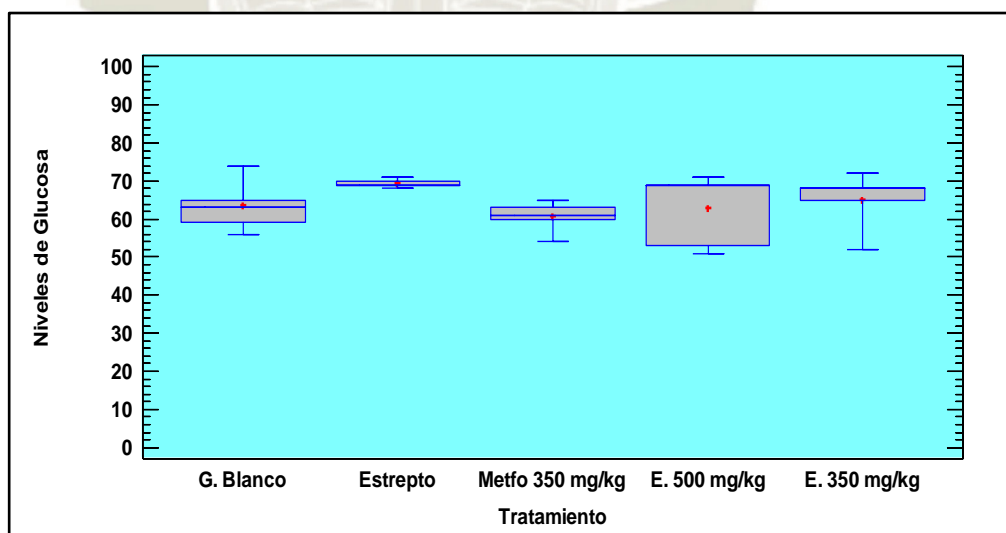
Se realizó el ANOVA a un nivel de confianza del 95% en el cual se muestra que las diferencias entre los niveles de glucosa basal entre los grupos de experimentación no son significativas ($p > 0.05$) ANEXO N° 11.

TABLA N° 6: Comparación de la concentración de glucosa basal (mg/dL) entre los grupos experimentales

Tratamientos	Casos	Media (mg/dL)
Grupo blanco	5	63.4
Estreptozotocina	5	69.4
Extracto 500mg/Kg	5	62.6
Extracto 350 mg/Kg	5	65.0
Metformina 350 mg/Kg	5	60.6
Valor F		1.25
Valor P		0.3232

La TABLA N°6 y la FIGURA N°38 se observa la comparación de la concentración de glucosa basal de los grupos de experimentación en los que los valores están entre un rango de 60.6 mg/dL a 69.4 mg/dL.

FIGURA N°38: Comparación de la concentración de glucosa basal (mg/dL) entre los grupos experimentales



Aplicado el tratamiento estadístico se concluye que la experimentación se inicia en igualdad de condiciones en todos los grupos experimentales, justificando que la etapa de ambientación y estandarización fue fundamental para el inicio del trabajo experimental.

5.2.2. EVALUACIÓN GLUCOSA POST-STZ (DÍA 0):

Los niveles de glucosa fueron monitoreados después de 48 horas de aplicada la STZ, a partir de este día se inició el tratamiento durante 30 días.

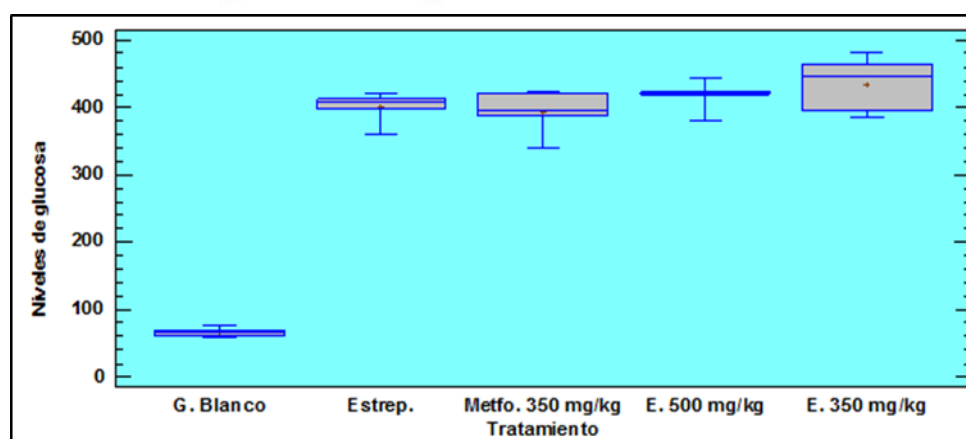
Se realizó el ANOVA a un nivel de confianza de 95% donde se evidencia que el valor $p < 0.01$, lo que indica la diferencia altamente significativa entre los grupos experimentales. ANEXO N°12

TABLA N°7: Comparación de la concentración de glucosa (mg/dL) post-estreptozotocina entre los grupos experimentales

TRATAMIENTOS	CASOS	MEDIA (mg/dL)	TUKEY
Grupo Blanco	5	65.6	A
Estreptozotocina	5	400.2	B
Extracto 500 mg/Kg	5	417.8	B
Extracto 350 mg/Kg	5	434.6	B
Metformina 350 mg/Kg	5	393.6	B

En la TABLA N°7 y FIGURA N° 39 se evidencia las diferencias entre los grupos, se aplicó el test Tukey, que revela que el Grupo Blanco discrepa significativamente de los demás grupos que mostraron una elevación de valores de hasta 434.6 mg/dL, esto indica que la inducción a hiperglucemia se realizó con éxito.

FIGURA N°39: Comparación de la concentración de glucosa (mg/dL) post-estreptozotocina entre los grupos experimentales



Los dos principales componentes que son utilizados para inducir la diabetes: STZ y Aloxano, dado que presentan similitud en su estructura con la glucosa, esta puede competir con aloxano y STZ, y por lo tanto los animales en ayunas tienden a ser más susceptibles por lo cual antes de la aplicación de la STZ los animales estuvieron con 12 horas de ayuno, se recomienda la preparación de STZ inmediatamente antes de la inyección.⁵³

Los valores de hiperglucemia inducida por STZ en los grupos de ratas Wistar logran incrementos considerables de los niveles de glucosa que van desde valores entre 393.6 mg/dL en grupo Metformina a 434.6 mg/dL en el grupo de extracto de moringa a 350 mg/Kg, lo cual evidencia que se logró con éxito la inducción de hiperglucemia en ratas con esta dosis; lo mismo lo comprueba el estudio realizado por Muhammad Zafar y Syed Naeem-ul-Hassan Naqvi titulado “Effects of STZ-Induced Diabetes on the Relative Weights of Kidney, Liver and Pancreas in Albino Rats: A Comparative Study”, donde trabajaron a una dosis de 45 mg/Kg también llegando a niveles de glucosa siendo el más alto de 322.2 mg/dL.⁶⁹

5.2.3. EVALUACIÓN GLUCOSA DÍA 5:

Se realizó el ANOVA a un nivel de confianza de 95% donde se evidencia que el valor $p < 0.01$, lo que indica la diferencia altamente significativa entre los grupos experimentales. ANEXO N°13

TABLA N° 8: Comparación de la concentración de glucosa (mg/dL) al 5to día entre los grupos experimentales a diferentes tratamientos

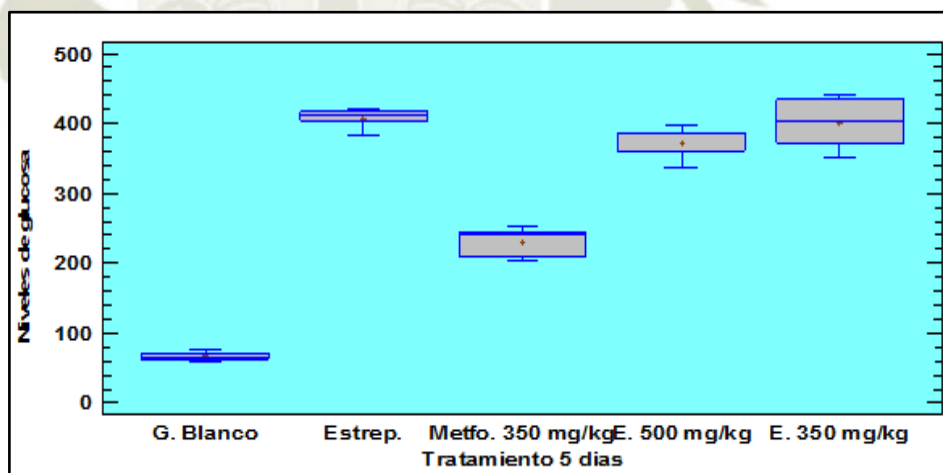
TRATAMIENTOS	CASOS	MEDIA (mg/dL)	TUKEY
Grupo Blanco	5	68.2	A
Estreptozotocina	5	406.6	C
Extracto 500 mg/Kg	5	372.6	C
Extracto 350 mg/Kg	5	400.4	C
Metformina 350 mg/Kg	5	230.2	B

En la TABLA N°8 y FIGURA N° 40 se evidencia las diferencias entre los grupos, se aplicó el test Tukey, este revela que a los cinco días de tratamiento el Grupo Blanco discrepa significativamente de los demás, manteniendo un valor en los niveles de glucosa de 68.2 mg/dL por lo cual se hace notar que la dieta no tiene mayor relevancia.

Adicionalmente el grupo Metformina muestra una diferencia significativa ya que el fármaco actúa con mayor rapidez llegando a un promedio de 230 mg/dL en los niveles de glucosa a diferencia de los grupos Extracto a dosis de 500 y 350 mg/Kg que llegaron a promedios de 372.6 y 400.4 mg/dL respectivamente.

El grupo STZ tuvo un leve aumento en los niveles de glucosa con un promedio de 406.6 mg/dL, puesto que este grupo no recibió ningún tratamiento, no mostrando diferencia significativa con los grupos Extracto.

FIGURA N° 40: Comparación de la concentración de glucosa (mg/dL) al 5to día entre los grupos experimentales a diferentes tratamientos



La medición de los niveles de glucosa cada 5 días después de iniciado los tratamientos con el glucómetro, fue trabajado por Mamani y Palomino en su estudio titulado “Efecto hipoglicemiante de la asociación de *Smallanthus sonchifolius* “yacón” y *Geranium dielsianum* “pasuchaca” en ratas con diabetes inducida experimentalmente”, donde los resultados fueron

satisfactorios y los datos obtenidos fueron suficientes para la aplicación de un tratamiento estadístico.⁷⁹

5.2.4. EVALUACIÓN GLUCOSA DÍA 10:

Se realizó el ANOVA a un nivel de confianza de 95% donde se evidencia que el valor $p < 0.01$, lo que indica la diferencia altamente significativa entre los grupos experimentales. ANEXO N°14.

TABLA N° 9: Comparación de la concentración de glucosa (mg/dL) al 10mo día entre los grupos experimentales a diferentes tratamientos

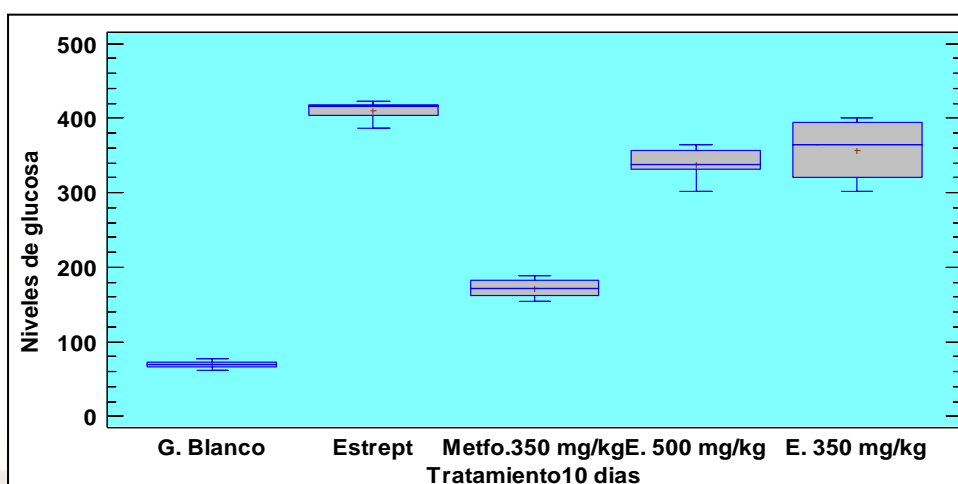
TRATAMIENTOS	CASOS	MEDIA (mg/dL)	TUKEY
Grupo Blanco	5	69.6	A
Estreptozotocina	5	409.4	D
Extracto 500 mg/Kg	5	338.0	C
Extracto 350 mg/Kg	5	356.6	C
Metformina 350 mg/Kg	5	171.6	B

En la TABLA N°9 y FIGURA N° 41 se evidencia las diferencias entre los grupos, se aplicó el test Tukey, este revela que a los diez días de tratamiento el Grupo Blanco discrepa significativamente de los demás, manteniendo un valor en los niveles de glucosa de 69.6 mg/dL por lo cual se hace notar que la dieta no tiene mayor relevancia.

El grupo Metformina muestra una diferencia significativa ya que el fármaco actúa con mayor rapidez llegando a un promedio de 171.6 mg/dL en los niveles de glucosa a diferencia de los grupos Extracto a dosis de 500 y 350 mg/kg que llegaron a promedios de 338.0 y 356.6 mg/dL respectivamente.

El grupo STZ tuvo un leve aumento en los niveles de glucosa con un promedio de 409.4 mg/dL, puesto que este grupo no recibió ningún tratamiento, a este nivel ya se presenta una diferencia significativa frente a los grupos de Extracto.

FIGURA N° 41: Comparación de la concentración de glucosa (mg/dL) al 10mo día entre los grupos experimentales a diferentes tratamientos



5.2.5. EVALUACIÓN GLUCOSA DÍA 15:

Se realizó el ANOVA a un nivel de confianza de 95% donde se evidencia que el valor $p < 0.01$, lo que indica la diferencia altamente significativa entre los grupos experimentales. ANEXO N°15.

TABLA N° 10: Comparación de la concentración de glucosa (mg/dL) al 15vo día entre los grupos experimentales a diferentes tratamientos

TRATAMIENTOS	CASOS	MEDIA (mg/dL)	TUKEY
Grupo Blanco	5	71.2	A
Estreptozotocina	5	412.2	E
Extracto 500 mg/Kg	5	258.4	C
Extracto 350 mg/Kg	5	306.0	D
Metformina 350 mg/Kg	5	146.8	B

En la TABLA N°10 y FIGURA N° 42 se evidencia las diferencias significativas entre todos los grupos, se aplicó el test Tukey, este revela que a los quince días de tratamiento todos los grupos discrepan entre sí.

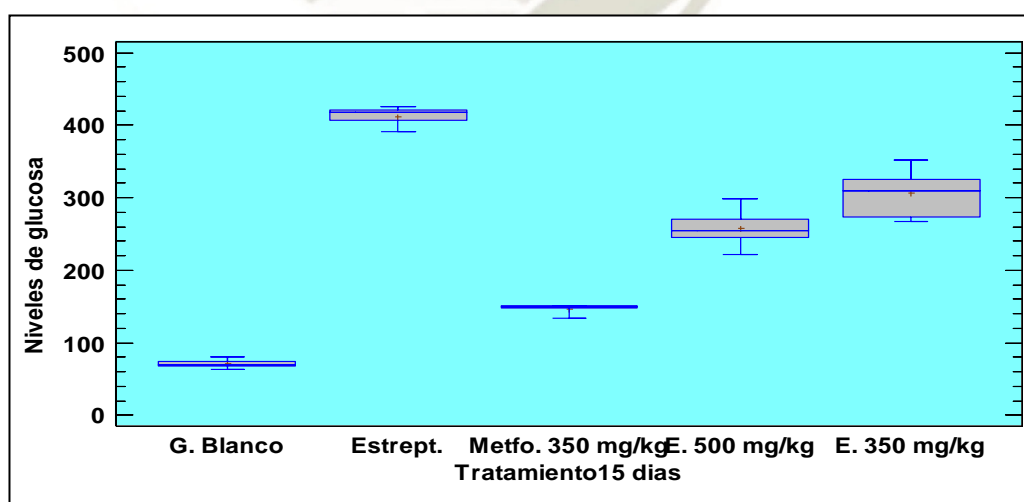
El grupo Blanco sigue conservando los niveles de glucosa en un promedio de 71.2 mg/dL que indica que la dieta no tiene mayor relevancia en estos niveles.

El grupo Metformina muestra una diferencia significativa llegando a un promedio de 146.8 mg/dL, además se observa la diferencia significativa de los promedios entre los grupos Extracto a dosis de 500 y 350 mg/Kg que llegaron a 258.4 y 306 mg/dL respectivamente. Se observa que los promedios de la concentración de niveles de glucosa van disminuyendo en los grupos que reciben tratamiento, en comparación a la concentración de niveles de glucosa del grupo STZ.

En este tiempo de evaluación se apreció una marcada diferencia entre los tratamientos, es decir con Metformina se obtiene la mayor disminución de los niveles de glucosa, seguido por el extracto de Moringa a una dosis de 500 mg/Kg.

El grupo STZ mantuvo los niveles de glucosa altos con un promedio de 412.2 mg/dL, puesto que este grupo no recibió ningún tratamiento, mostrando diferencia significativa con todos los grupos de experimentación.

FIGURA N° 42: Comparación de la concentración de glucosa (mg/dL) al 15vo día entre los grupos experimentales a diferentes tratamientos



5.2.6. EVALUACIÓN GLUCOSA DÍA 20:

Se realizó el ANOVA a un nivel de confianza de 95% donde se evidencia que el valor $p < 0.01$, lo que indica la diferencia altamente significativa entre los grupos experimentales. ANEXO N°16.

TABLA N° 11: Comparación de la concentración de glucosa (mg/dL) al 20vo día entre los grupos experimentales a diferentes tratamientos

TRATAMIENTOS	CASOS	MEDIA (mg/dL)	TUKEY
Grupo Blanco	5	72.4	A
Estreptozotocina	5	416.8	E
Extracto 500 mg/Kg	5	192.8	C
Extracto 350 mg/Kg	5	250.8	D
Metformina 350 mg/Kg	5	116.6	B

En la TABLA N°11 y FIGURA N°43 se evidencia las diferencias significativas entre todos los grupos, se aplicó el test Tukey, este revela que a los veinte días de tratamiento todos los grupos discrepan entre sí.

El grupo Blanco sigue conservando los niveles de glucosa en un promedio de 72.4 mg/dL que indica que la dieta no tiene mayor relevancia en estos niveles.

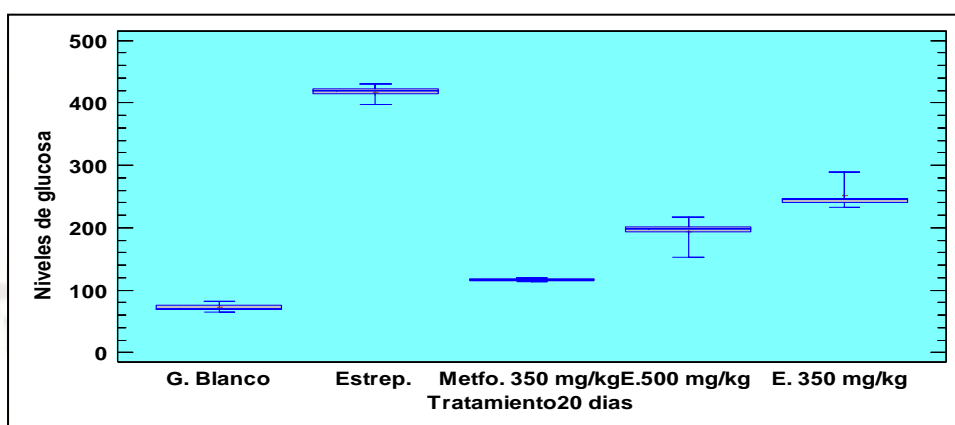
El grupo Metformina muestra una diferencia significativa llegando a un promedio de 116.6 mg/dL, además se observa la diferencia significativa de los promedios entre los grupos Extracto a dosis de 500 y 350 mg/Kg que llegaron a 192.8 y 250.8 mg/dL respectivamente.

Se observa que los promedios de la concentración de niveles de glucosa van disminuyendo en los grupos que reciben tratamiento, en comparación a la concentración de niveles de glucosa del grupo STZ.

En este tiempo de evaluación se apreció una marcada diferencia entre los tratamientos, es decir con Metformina se obtiene la mayor disminución de los niveles de glucosa, seguido por el extracto de Moringa a una dosis de 500 mg/Kg.

El grupo STZ mantuvo los niveles de glucosa altos con un promedio de 416.8 mg/dL, puesto que este grupo no recibió ningún tratamiento, mostrando diferencia significativa con todos los grupos de experimentación.

FIGURA N° 43: Comparación de la concentración de glucosa (mg/dL) al 20vo día entre los grupos experimentales a diferentes tratamientos



5.2.7. EVALUACIÓN GLUCOSA DIA 25:

Se realizó el ANOVA a un nivel de confianza de 95% donde se evidencia que el valor $p < 0.01$, lo que indica la diferencia altamente significativa entre los grupos experimentales. ANEXO N°17.

TABLA N° 12: Comparación de la concentración de glucosa (mg/dL) al 25vo día entre los grupos experimentales a diferentes tratamientos

TRATAMIENTOS	CASOS	MEDIA (mg/dL)	TUKEY
Grupo Blanco	5	73.4	A
Estreptozotocina	3	418.3	D
Extracto 500 mg/Kg	5	151.0	C
Extracto 350 mg/Kg	5	162.4	C
Metformina 350 mg/Kg	5	89.8	B

En la TABLA N°12 y FIGURA N°44 se evidencia las diferencias significativas entre todos los grupos, se aplicó el test Tukey, este revela que a

los veinticinco días de tratamiento los grupos Blanco, Metformina, Extracto a las dos dosis y STZ discrepan entre sí.

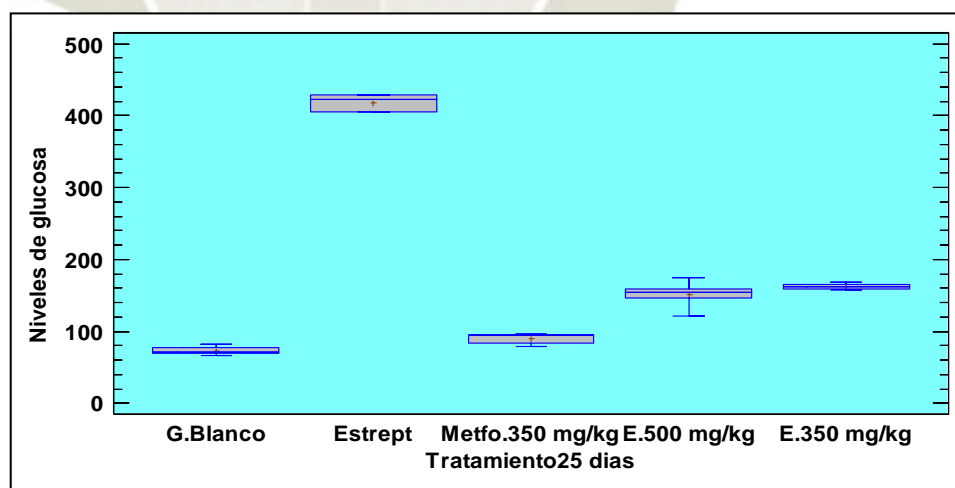
El grupo Blanco sigue conservando los niveles de glucosa en un promedio de 73.4 mg/dL que indica que la dieta no tiene mayor relevancia en estos niveles.

El grupo Metformina muestra una diferencia significativa llegando a un promedio de 89.8 mg/dL, que tiene a acercarse a los valores normales.

Los grupos Extracto a dosis de 500 y 350 mg/Kg que llegaron a 151 y 162.4 mg/dL respectivamente, no muestran diferencia significativa en este periodo de tiempo.

Se observa que los promedios de la concentración de niveles de glucosa van disminuyendo en los grupos que reciben tratamiento, en comparación a la concentración de niveles de glucosa del grupo STZ, que mantiene altos niveles de glucosa en un promedio de 418.33 y es a este tiempo donde se produce el deceso de dos unidades de estudio (ratas).

FIGURA N° 44: Comparación de la concentración de glucosa (mg/dL) al 25vo día entre los grupos experimentales a diferentes tratamientos



5.2.8. EVALUACIÓN GLUCOSA DIA 30:

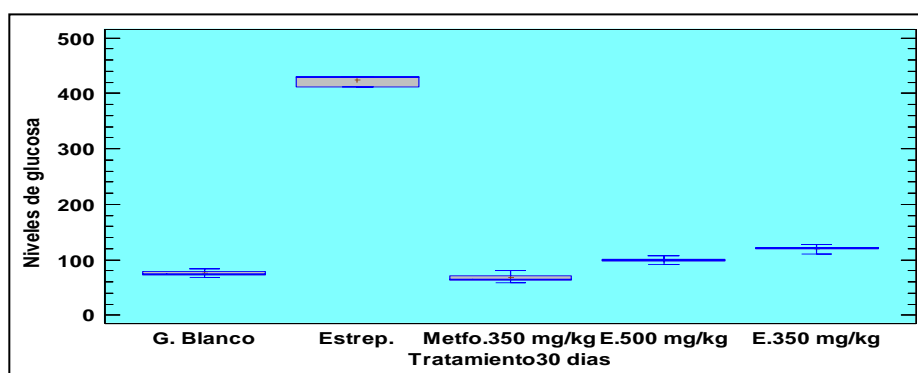
Se realizó el ANOVA a un nivel de confianza de 95% donde se evidencia que el valor $p < 0.01$, lo que indica la diferencia altamente significativa entre los grupos experimentales. ANEXO N°18.

TABLA N° 13: Comparación de la concentración de glucosa (mg/dL) al 30vo día entre los grupos experimentales a diferentes tratamientos

TRATAMIENTOS	CASOS	MEDIA (mg/dL)	TUKEY
Grupo Blanco	5	75.6	A
Estreptozotocina	3	424.0	D
Extracto 500 mg/Kg	5	99.6	B
Extracto 350 mg/Kg	5	120.2	C
Metformina 350 mg/Kg	5	68.0	A

En la TABLA N°13 y FIGURA N°45 se evidencia las diferencias significativas entre los grupos, se aplicó el test Tukey, este revela que a los treinta días dos grupos guardan similitud. El grupo Blanco guarda similitud con el grupo Metformina 350 mg/Kg en donde los promedios de los niveles de glucosa están en 75.6 mg/dL y 68 mg/dL respectivamente, lo que concluye que el grupo Metformina alcanzó sus valores basales de glucosa al final del tratamiento. El grupo Extracto a dosis de 500 mg/Kg al finalizar el tratamiento alcanza un promedio de niveles de glucosa de 99.6 mg/dL, mostrando una diferencia significativa respecto al grupo Extracto a una dosis de 350 mg/Kg que llegó a una promedio de 120.2 mg/dL, por lo tanto se concluye que el extracto con mayor dosis muestra un efecto hipoglucemiante mejor en este periodo de tratamiento. El promedio de los niveles de glucosa del grupo STZ, se mantiene en niveles altos 424 mg/dL.

FIGURA N° 45: Comparación de la concentración de glucosa (mg/dL) al 30vo día entre los grupos experimentales a diferentes tratamientos



La dosis elegida de Metformina fue de 350 mg/Kg usada para el control positivo en la realización del presente trabajo, ya que en el estudio realizado por Figueroa, Díaz, Camacho y López titulado “Efectos inducidos por *Ruta graveolens* L., *Cnidioscolus chayamansa* McVaugh y *Citrus aurantium* L. sobre los niveles de glucosa, colesterol y triacilglicéridos en un modelo de rata diabética.”, la inducción experimental fue con aloxano y utilizó como uno de sus controles positivos Metformina 350 mg/kg por un periodo de 30 días llegando a un valor final de niveles de glucosa de 130 mg/dL, en comparación con el presente trabajo Metformina 350mg/Kg llegó a un porcentaje de reducción del 82.61 %.⁸⁰

Con la finalidad de determinar la dosis del extracto de Moringa con mayor efecto hipoglucemiante y la dosis adecuada se realizó una revisión bibliografía, en el estudio realizado por los investigadores Hafiz Muhammad Irfan, Mohd Zaini Asmawi, Nurzalina Abdul Karim Khan y Amirin Sadikun, titulado “Effect of Ethanolic Extract of *Moringa oleifera* Lam. Leaves on Body Weight and Hyperglycemia of Diabetic Rats.” el extracto de hojas con dosis de 1000, 500, 250, 125 mg / kg de peso corporal por vía oral, mostrando un efecto mayor en las dosis más altas, por lo cual se determinó trabajar con dosis de 350 y 500 mg/Kg de peso, obteniendo buenos resultados, con una dosis de 350 mg/Kg de peso se logró una disminución 72.22 % y con una dosis de 500 mg/Kg de peso se logró una disminución de 76.14 %.⁸¹

5.2.9. EVOLUCIÓN DE LOS NIVELES DE GLUCOSA DURANTE 30 DIAS DE TRATAMIENTO:

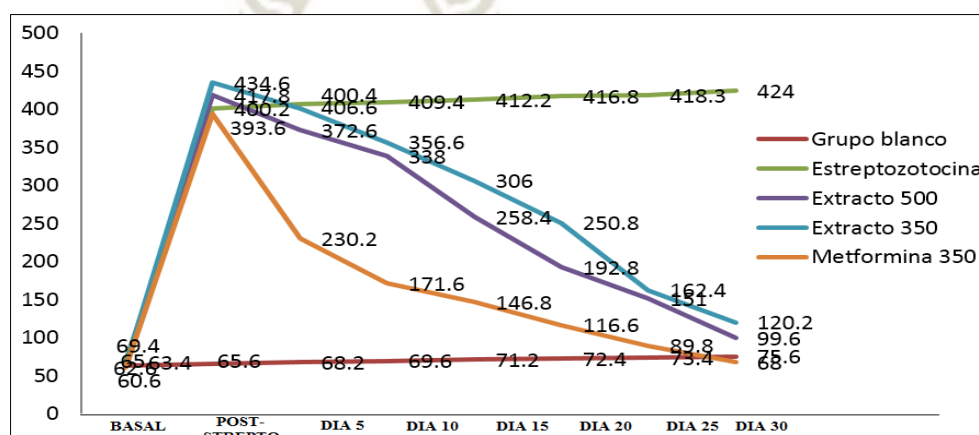
En cuanto a la interacción TABLA N° 15 y FIGURA N°46 se evidencia claramente que en el grupo Blanco los niveles de glucosa permanecen estables con promedios 69 mg/dL, los grupos a los cuales se aplicó la STZ logran incrementos considerables en los niveles de glucosa con un mínimo que fue de 393.6 mg/dL en el grupo Metformina, y el valor máximo 434.6 mg/dL en el grupo de extracto de Moringa a 350 mg/Kg.

TABLA N° 14: Evolución de los niveles de glucosa promedio (mg/dL) de los diferentes grupos experimentales durante el tratamiento

TRATAMIENTOS (mg/Kg)	CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA (mg/dL)							
	BA SAL	DIA 0	DIA 5	DIA 10	DIA 15	DIA 20	DIA 25	DIA 30
Grupo blanco	63.4	65.6	68.2	69.6	71.2	72.4	73.4	75.6
Estreptozotocina	69.4	400.2	406.6	409.4	412.2	416.8	418.3	424.0
Extracto 500	62.6	417.8	372.6	338.0	258.4	192.8	151.0	99.6
Extracto 350	65.0	434.6	400.4	356.6	306.0	250.8	162.4	120.2
Metformina 350	60.6	393.6	230.2	171.6	146.8	116.6	89.8	68.0

Las unidades experimentales tratadas con Metformina a partir de los 5 días hasta los 30 días logran una disminución de los niveles de glucosa llegando a un promedio de 68 mg/dL a los 30 días de tratamiento que se iguala al valor inicial. A las que se les administro el extracto etanólico de hojas de Moringa a 500 mg/Kg se produjo una disminución desde los 5 días hasta los 30 días llegando a un promedio de 99.6 mg/dL el cual se encuentra muy cerca al valor inicial, y con 350 mg/Kg del extracto etanólico de hojas de Moringa se llega a los 30 días a un promedio de 120.2 mg/dL en los niveles de glucosa.

FIGURA N° 46: Evolución de los niveles de glucosa promedio (mg/dL) de los diferentes grupos experimentales durante el tratamiento



De acuerdo a estos resultados se puede afirmar que el extracto etanólico de *Moringa oleífera* Lam a la concentración de 500 mg/Kg es efectiva necesitándose quizás un periodo más amplio de tratamiento para ser más semejantes a los valores basales.

Tal como lo evidencia Yassa y Tohamy., 2014 en su estudio titulado “Extract of *Moringa oleífera* leaves ameliorates streptozotocin-induced Diabetes mellitus in adult rats”, ellos prepararon un extracto acuoso de hojas secas pulverizadas que fue probado en ratas Sprague-Dawley machos con diabetes que fue inducido por STZ y se observó que las ratas con diabetes tratadas con dicho extracto de hojas tuvieron una reducción significativa en niveles de glucosa, donde además reportan la actividad de los flavonoides como quercetina y kaempferol presentes en el extracto de hojas de Moringa, responsables del efecto hipoglucemiante.¹¹

La disminución de los niveles de glucosa en la presente investigación corrobora lo encontrado en otras investigaciones similares, como por ejemplo el estudio realizado por Edoga, Njoku, Amadi y Okeke, titulado “Blood Sugar Lowering Effect of *Moringa Oleífera* Lam in Albino Rats” sobre los efectos hipoglucemiantes de *Moringa oleífera* en el cual se logra exhibir efectos hipoglucémicos significativos, el extracto mostró un efecto dependiente de la dosis , se trabajó tres dosis de extracto acuoso de *Moringa oleífera* 100, 200, 300 mg/Kg de peso con lo cual obtuvieron una reducción del 33,29%, 40,69% y 44,06% respectivamente de la concentración de glucosa en sangre, ellos concluyeron que al aumentar la dosis, aumenta el porcentaje de disminución.⁸²

5.2.10. COMPARACIÓN DE AREAS BAJO LA CURVA DE LOS DIFERENTES TRAMIENTOS DURANTE EL TIEMPO DE TRATAMIENTO:

Se realizó el cálculo de las áreas correspondientes a cada tratamiento desde la medición basal hasta el término del tratamiento, posteriormente se le aplicó el tratamiento estadístico, ANOVA resultando el valor $p < 0.001$, que indica una diferencia altamente significativa. ANEXO N°20.

Posteriormente se realizó la prueba de Tukey dado que existía diferencia significativa entre los grupos de tratamientos.

TABLA N° 15: Comparación del área bajo la curva de los diferentes tratamientos

Tratamientos	Casos	Media	TUKEY
G. Blanco	5	2124.6	A
Metformina	5	4535	B
Extracto 500	5	7416.8	C
Extracto 350	5	8458.8	D
Estreptozotocina	5	11972.2	E

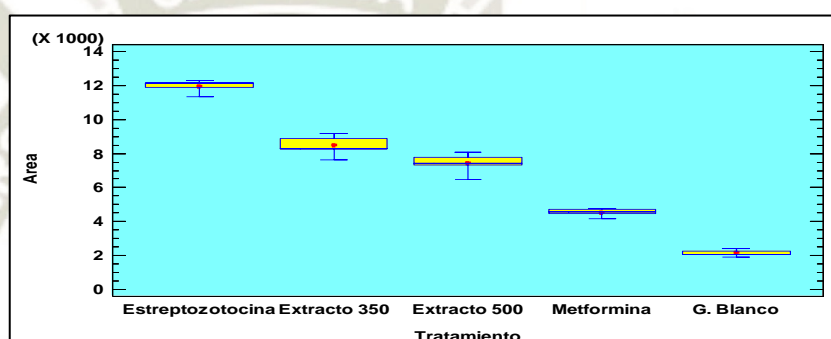
El área bajo la curva calculada para los diferentes tratamiento son diferentes estadísticamente. Esto quiere decir que la menor área corresponde al grupo Blanco en donde la media fue de 2124.6, este grupo no fue inducido a hiperglucemia, además se continuó con la dieta habitual manteniendo sus niveles de glucosa sin variaciones significativas.

El grupo Estreptozotocina fue el que desarrolló una mayor área bajo la curva con una media de 11972.2, ya que este grupo fue inducido a hiperglucemia y el tratamiento fue un placebo (agua destilada) por tanto los valores se mantuvieron elevados durante los 30 días de tratamiento, incluso mostrando una ligera tendencia a la elevación.

Respecto a los grupos de tratamiento, el grupo Metformina mostró una área bajo la curva con un valor de 4535, cercano al grupo Blanco pero estadísticamente diferente, esto puede explicarse por el pico producido en la hiperglucemia y su rápido descenso en los niveles de glucosa, ya que al ser un fármaco antihiperglucemiante el efecto se logra en un menor tiempo de tratamiento. En cuanto a los grupos de los extractos a dosis de 350 mg/kg y 500mg/kg mostraron valores de áreas de 7416.8 y 8458.8 respectivamente, no llegando a un área similar al grupo Metformina pero si menor en comparación al grupo STZ

En la FIGURA N° 47 se observa el gráfico de las áreas por los diferentes tratamientos en donde comparamos el efecto producido en el tiempo de tratamiento verificando que el grupo Metformina fue el que alcanzó la disminución de valores de glucosa en un menor tiempo y por esto su área bajo la curva fue menor. Los extractos alcanzaron un área mayor pero diferente al grupo STZ, concluyendo que si existe un efecto hipoglucemiante en este periodo de tratamiento.

FIGURA N° 47: Comparación del área bajo la curva de los diferentes tratamientos



5.2.11. FLUCTUACIÓN DE LOS NIVELES DE GLUCOSA DURANTE 30 DIAS DE TRATAMIENTO:

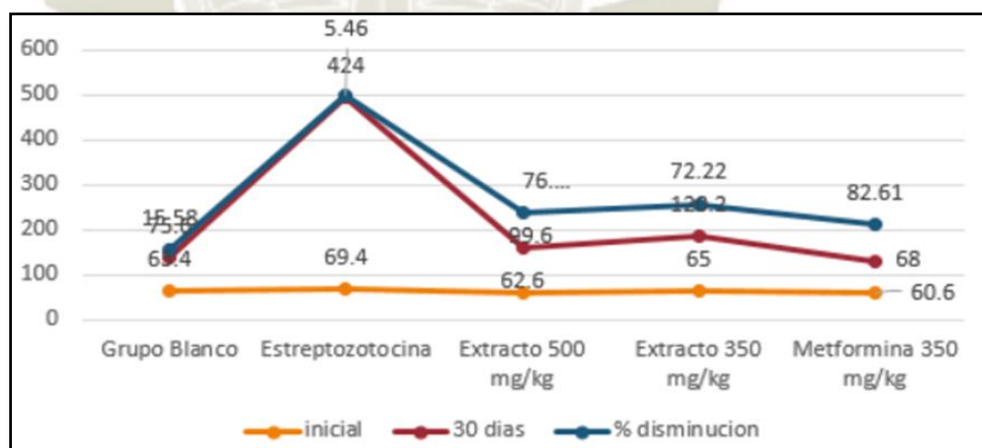
TABLA N°16: Efecto de concentración de moringa sobre fluctuaciones de glucosa (mg/dL) después de 30 días de tratamiento

Tratamiento (mg/Kg)	Promedio Inicial	Promedio Post-STZ	Promedio 30 días	Promedio disminución	% disminución
Extracto 500	62.6 +/- 9.74	417.8 +/- 22.62	99.6 +/- 5.41	318.2 +/- 19.26	76.14
Extracto 350	65 +/- 7.68	434.6 +/- 42.65	120.2 +/- 6.49	314.4 +/- 38.04	72.22
Metformina 350	60.6 +/- 4.16	393.6 +/- 34.44	68 +/- 8.66	325.6 +/- 35.24	82.61
Estreptozotocina	69.4 +/- 1.14	400.2 +/- 23.29	424 +/- 10.44	34.67 +/- 14.57	5.46
Grupo Blanco	63.4 +/- 6.88	65.6 +/- 7.23	75.6 +/- 6.11	10 +/- 2.45	-----

En la TABLA N° 16 y FIGURA N°48 se muestra los resultados de los niveles de glucosa inicial los cuales fluctúan entre un promedio de 60.6 +/- 4.46 mg/dL a 69.4 +/- 1.14 mg/dL; luego los niveles de glucosa después de la aplicación de la STZ se incrementan hasta un promedio que fluctua 393.6 +/- 34.44 mg/dL a 434.6 +/- 42.65 mg/dL.

Los niveles promedios de glucosa a los 30 días muestran que con Metformina llegan a un promedio de 68 +/- 8.66 mg/dL presentando una disminución del 82.61%, con el extracto de hojas de moringa a 500 mg/Kg a los 30 días llega a un promedio de 99.6 +/- 5.41 mg/dL llegando a un porcentaje de disminución de los niveles de glucosa de 76.14% con extracto a 350 mg/Kg se llega a los 30 días de tratamiento a niveles de glucosa 120.2 +/- 6.49 mg/dL y un porcentaje de disminución de 72.22%. El grupo que recibió STZ mostro un leve aumento en los valores de glucosa 5.46 % durante toda la experimentación, lo que da de manifiesto la efectividad de la Moringa fue a una dosis de 500 mg/Kg.

FIGURA N°48: Efecto de concentración de moringa sobre fluctuaciones de glucosa (mg/dL) después de 30 días de tratamiento



6. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

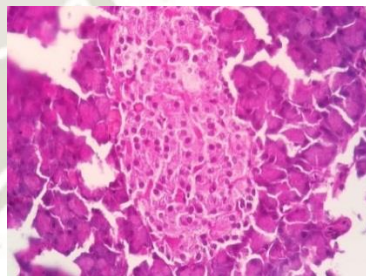
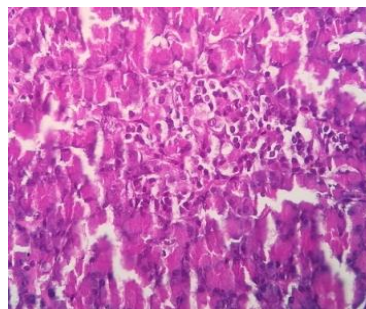
Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, extrayendo los órganos hígado y páncreas, detallando los resultados a continuación.

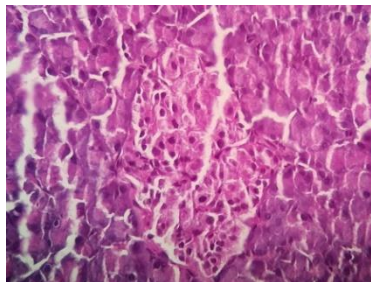
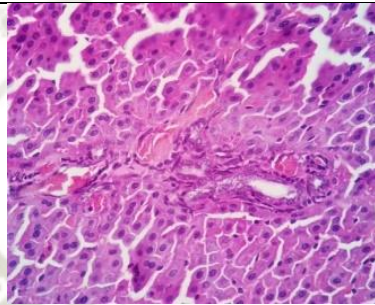
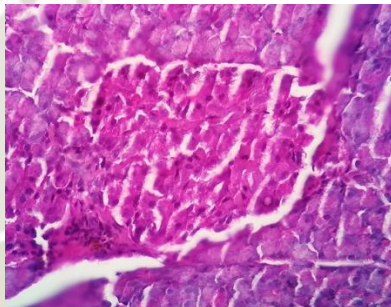
✓ **Páncreas:**

En las ratas con hiperglucemia inducida por STZ se visualizó infiltrado inflamatorio, el cual reemplazaba las células dañadas del islote pancreático además de anormalidades en su arquitectura; respecto a las ratas tratadas con el extracto etanólico de Moringa a una dosis de 500 y 350 mg/Kg se observó una arquitectura histológica conservada y no había evidencia del infiltrado inflamatorio; por último en el grupo metformina se observa una moderada congestión y turbidez.

Los resultados se detallan en la TABLA N° 17.

TABLA N°17: Estudio histopatológico de páncreas de los grupos de experimentación

PÁNCREAS		
OBSERVACIONES	CONCLUSIÓN	IMAGEN
<p>GRUPO BLANCO</p> <p>Las ratas blanco presentaron una histología pancreática sin alteraciones microscópicas además el número de islotes de Langerhans es adecuado.</p>	<p>Morfología Normal</p>	
<p>GRUPO CONTROL STZ</p> <p>Las ratas control negativo se evidencia anormalidades en la arquitectura histológica, con presencia de material eosinófilo e infiltrado inflamatorio compuesto por polimorfonucleares y linfocitos.</p>	<p>Infiltrado inflamatorio de reemplazo en el tejido pancreático</p>	

<p>GRUPO EXTRACTO MORINGA 500 mg/Kg</p> <p>Se observa la presencia de islotes de Langerhans sin presencia de infiltrado inflamatorio y sin alteraciones arquitecturales.</p>	<p>Morfología Normal</p>	
<p>GRUPO EXTRACTO MORINGA 350 mg/Kg</p> <p>Disminución número células de islotes de Langerhans, y con estructuras bien definidas.</p>	<p>Leve congestión</p>	
<p>GRUPO METFORMINA 350 mg/Kg</p> <p>Disminución del número de células de Langerhans en comparación al grupo blanco, pero estructuras celulares definidas.</p>	<p>Moderada congestión y turbidez</p>	

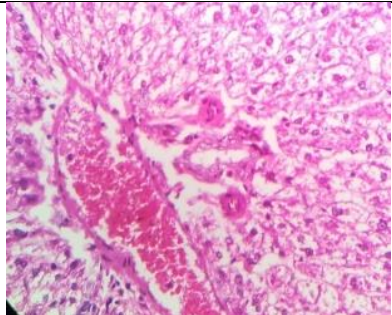
✓ HÍGADO:

En las ratas con hiperglucemia inducida por STZ se observa edema de hepatocitos además dilatación y congestión vascular; respecto a las ratas tratadas con el extracto etanólico de Moringa a una dosis de 500 y 350 mg/Kg se observó una arquitectura histológica conservada y leve edema, al igual que el grupo de Metformina.

Los resultados se detallan en la TABLA N°18.

TABLA N°18: Estudio histopatológico de páncreas de los grupos de experimentación

HÍGADO		
OBSERVACIONES	CONCLUSIONES	IMAGEN
<p>GRUPO BLANCO</p> <p>Histología hepática sin alteraciones microscópicas significativas.</p>	<p>Morfología normal</p>	
<p>GRUPO STZ</p> <p>Se observa edema de hepatocitos principalmente en los circundantes de los espacios porta, además dilatación y congestión vascular.</p>	<p>Daño hepático severo</p>	
<p>GRUPO EXTRACTO MORINGA 500 mg/Kg</p> <p>Se observa hepatocitos con leve edema, arquitectura histológica conservada</p>	<p>Leve edema</p>	
<p>GRUPO EXTRACTO MORINGA 350 mg/Kg</p> <p>Se observa hepatocitos con leve edema, arquitectura histológica conservada.</p>	<p>Leve edema</p>	

<p>GRUPO METFORMINA 350 mg/Kg</p> <p>Se observa hepatocitos con leve edema, arquitectura histológica sin alteraciones significativas.</p>	<p>Leve edema</p>	
--	--------------------------	---

Los análisis histopatológicos realizado a los órganos (páncreas y hígado), fue realizado con la tinción Hematoxilina-eosina el extracto etanólico de hojas de moringa mostro tener un efecto protector de estos órganos dado que se puede apreciar islotes con buen tamaño, los islotes se encuentran protegidos de daño celular, libre de necrosis y hemorragia; en contraste al grupo STZ que muestra una reducción clara de los islotes pancreáticos, de forma irregular, y los cambios atróficos. Estos resultados también coinciden con los encontrados por Licenciada en Nutricion Olga Karina Amador Garcia en su investigación titulada “Estudio bromatológico de las hojas de *Moringa oleífera* in vitro y ex vitroy análisis del efecto hipoglucemiante en ratas Wistar diabetizadas.”, donde sus resultados muestras que los extractos de Moringa tienen un efecto protector y de rejuvenecimiento de las células de los islotes de Langerhans.⁷⁵

Además del examen histológico del páncreas de ratas diabéticas realizado por Rajnish Gupta et al., 2011 titulado “Evaluation of antidiabetic and antioxidant activity of *Moringa oleífera* in experimental diabetes.” mostraron que el tratamiento de extracto metanólico de *Moringa oleífera* invirtió significativamente el daño histoarquitectónico a las células de los islotes, con lo que se avala lo encontrado en nuestro estudio histológico, donde muestran resultados similares.⁸³

De los estudios podemos decir que los tratamiento a base de plantas naturales van a requerir dosis elevadas a diferencia de los fármacos tradicionales que ha dosis pequeñas pueden controlar la hiperglucemia. Sin embargo según nuestro estudio el tratamiento con 500 mg/kg de extracto etanólico de hojas

de Moringa y el tratamiento con metformina presentan un efecto hipoglucemiante similar y en un mismo tiempo; por lo tanto esta investigación nos sirvió para demostrar que el extracto etanólico a una dosis de 500 mg/kg va a poseer mejor actividad hipoglucemiante y podría ser considerada como una buena alternativa natural en el tratamiento de hiperglucemia.⁵⁹



CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron los extractos con los solventes que se mencionan a continuación ordenados por su polaridad , de mayor a menor: etanol 96°, acetato etilo y éter etílico, de los cuales se obtuvieron rendimientos de 33.8%. 9.8% y 19.9% respectivamente.
2. El análisis fitoquímico se evidenció la presencia de grupos de metabolitos secundarios, en el extracto etanólico fueron: flavonoides, taninos, alcaloides y saponinas; respecto al extracto de acetato de etilo: flavonoides, alcaloides y; finalmente en el extracto de éter etílico: alcaloides.
3. Se comprobó el efecto del extracto etanólico de hojas de Moringa en animales de experimentación inducidos a hiperglucemia experimental, en los 30 días de tratamiento, no llegando a los valores basales pero se logró una disminución del 76.14% a la dosis de extracto de Moringa 500 mg/Kg.
4. La dosis que logro una disminución efectiva en los 30 días de tratamiento, fue la dosis de extracto de Moringa 500 mg/Kg logrando una disminución de 76.14%.
5. Se determinó que el extracto etanólico de hojas de Moringa a dosis de 350 y 500 mg/kg alcanzan un porcentaje de disminución 72.22% y 76.14% respectivamente , mientras que el grupo Metformina alcanza un porcentaje de disminución de 82.61%.
6. Se logró observar mediante el estudio histopatológico de páncreas, la protección de las células de los islotes de Langerhans sin alteraciones arquitecturales ni citológicas en los grupos a los que se aplicó el extracto de hojas de Moringa a dosis de 350 y 500 mg/Kg; por otra parte en el grupo STZ se evidenció infiltrado inflamatorio en reemplazo de las células dañadas de los islotes de Langerhans.

RECOMENDACIONES

1. Evaluar la dosis toxica del extracto etanólico de hojas de *Moringa oleífera Lam.* en animales de experimentación.
2. Identificación cuantitativa de los diferentes compuestos presentes en los extractos de hojas de *Moringa oleífera Lam.*
3. Realizar un estudio histológico mediante técnicas más específicas para una mejor determinación del daño pancreático y evaluar otros indicadores serológicos.
4. Realizar un estudio de asociación de un hipoglucemiante oral con extracto de hojas de *Moringa oleífera Lam.*



BIBLIOGRAFIA

1. Villar Lopez M, Villavicencio Vargas O. Manual de fitoterapia - Herbal medicine manual. Biblioteca virtual de desarrollo sostenible y salud ambiental. 2001. 405 p.
2. Olson ME, Fahey JW. *Moringa oleifera*: Un árbol multiusos para las zonas tropicales secas. Rev Mex Biodivers. 2011;82(4):1071–82.
3. Organización panamericana de la salud. Parte II: Hiperglucemia Diabetes *mellitus*. Guía Diagnóstico y Manejo18. 2002;295–309.
4. Villena J. Epidemiología de Diabetes *Mellitus* en el Perú. Vol. 55, Revista Diagnostico. 2016. p. 173–83.
5. Paul CW, Didia BC. The Effect of Methanolic Extract of *Moringa oleifera* Lam Roots on the Histology of Kidney and Liver of Guinea Pigs. Asian J Med Sci. 2012;4(1):55–60.
6. Ferreira PPM, Farias DF, Oliveira JTDA, Carvalho ADF. *Moringa oleifera*: compostos bioativos e potencialidade nutricional. Rev Nutr.2008;21(4):431–7.
7. Stevens, P. F. (2001 onwards). Angiosperm Phylogeny Website. Version 14, July 2017” [Internet] [cited 2018 Sept 21] Avalaible from: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.
8. Velázquez Zavala M, Peón Escalante IE, Zepeda Bautista R, Jiménez Arellanes MA. *Moringa (Moringa oleifera Lam.)*: potential uses in agriculture, industry and medicine. Rev Chapingo Ser Hortic. 2016;XXII(2):95–116.
9. Teixeira EMB, Carvalho MRB, Neves VA, Silva MA, Arantes-Pereira L. Chemical characteristics and fractionation of proteins from *Moringa oleifera* Lam. leaves. Food Chem [Internet]. 2014;147:51–4. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.135>
10. Alhakmani F, Kumar S, Khan SA. Estimation of total phenolic content, in-vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of flowers of *Moringa oleifera*. Asian Pac J Trop Biomed. 2013;3(8):623–7.
11. Yassa HD, Tohamy AF. Extract of *Moringa oleifera* leaves ameliorates streptozotocin-induced Diabetes *mellitus* in adult rats. Acta Histochem

- [Internet]. Urban & Fischer; 2014 Jun 1 [cited 2018 Sep 3];116(5):844–54. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S00651281140003971>.
12. Makkar HPS, Becker K. Nutrients and antiquality factors in different morphological parts of the *Moringa oleifera* tree. J Agric Sci. 1997;128(3):311–22.
 13. Morton JF. The Horseradish Tree, *Moringa pterygosperma* (Moringaceae)- a boon to arid lands. Econ Bot. 1991;45(1929):318–33.
 14. Pal SK, Mukherjee PK, Saha BP. Studies on the Antiulcer Activity of *Moringa oleifera* Leaf Extract on Gastric-Ulcer Models in Rats. Phyther Res. 1995;9(6):463–5.
 15. Urmi KF, Nurul NH, Abu AH, Hossain MK, Hamid K. Comparative antimicrobial activity and brine shrimp lethality bioassay of different parts of the plant *Moringa oleifera lam.* J Appl Pharm Sci. 2012;2(12):85–8.
 16. Caro Palomino NM. Estudio del efecto hipoglicemiante del extracto metanólico de *otholobium pubescens* (poiret) *grimes* “culén” en ratas wistar. Arequipa - 2010. 2015;1:89.
 17. Mayorga Luis. Fisiología Pancreática. Fisiol la Pract medica [Internet]. 2000;1t. Disponible en:
<http://med.javeriana.edu.co/fisiologia/autoestudio/FISIOLOGIAPANCREAS.PDF>
 18. Méndez Sánchez N, Mendoza FR, Méndez-sánchez N. Gastroenterología, 2e Sección XI: Páncreas. En: Segunda. 2010. p. 865.
 19. Longnecker D. Anatomy and Histology of the Pancreas. Pancreapedia Exocrine Pancreas [Internet]. 2014;332–9. Disponible en:
<http://www.pancreapedia.org/reviews/anatomy-and-histology-of-pancreas>
 20. Sastrea J, Sabaterb L, Aparisi L. Fisiología de la secreción pancreática. 2005;28(Supl 2):3–9. Available from:
<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.physiol.63.1.77>
 21. Mendieta EJJ. El páncreas endocrino. Research gate. 2011. 36 p.

22. Fernández-Tresguerres Jesús A. N. PARTE IX: Fisiología del sistema endocrino Capítulo 77: Páncreas endocrino. In: Fisiología Humana, 4e. Cuarta edición. 2010.
23. Ross, Michael H, Gordon I. Kaye, and Lynn J. Romrell. Histología: Texto Y Atlas Color. México, D.F. Editorial Médica Panamericana, 1999.
24. De Haro-Hernández R, Méndez JD. Neogénesis y regeneración de las células β pancreáticas. Gac Med Mex. 2002;138(6):557–64.
25. Olvera-Granados CP, Leo-Amador GE, Hernández-Montiel HL. Páncreas y células beta: mecanismos de diferenciación, morfogénesis y especificación celular endocrina. ¿Regeneración? Bol Med Hosp Infant Mex. 2008;65(4):306–24.
26. Rocca FF, Plá JC. Páncreas Endocrino. In: Diabetes *Mellitus*. 1963. p. 23–30.
27. Olimpo C, Anaya M, Darío I, Ariza S. Acción Insulínica Y Resistencia a La Insulina: Aspectos Moleculares. Rev Fac Med Univ Nac Colomb. 2005;53(4):235–44.
28. Ganong, William F. “Manual de Fisiología Médica”. 20ava Edición. Editorial Manual Moderno. México. 2006.
29. Katzung B, Masters S, Trevor A. “Farmacología básica y clínica” 12^{va} ed. México: Mc Graw-Hill. 2013. Sección VII. Fármacos con acción en el sistema endocrino. p743-768.
30. Brandan N, Llanos I, Miño C. Hormonas pancreáticas [Internet]. 2011. Disponible en: <https://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/BIOQUIMICA/hpancreas.pdf>
31. Rosas Guzmán J, Calles J, Friege F, Lara Esqueda A, Suverza A, Campuzano R, et al. Consenso de Prediabetes. Documento de posición de la Asociación Latinoamericana de Diabetes (ALAD). Alad [Internet]. 2017;7(4). Disponible en: http://www.revistaalad.com/files/alad_v7_n4_184-202.pdf
32. Hiperglucemia: American Diabetes Association® [Internet]. [cited 2018 Sep 5]. Disponible en: <http://www.diabetes.org/es/vivir-con-diabetes/tratamiento-y-cuidado/el-control-de-la-glucosa-en-la-sangre/hiperglucemia.html>
33. Diabetes DOF. Diagnosis and classification of diabetes *mellitus*. Diabetes Care. 2010;33(SUPPL. 1).

34. Alberti KGMM, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes *mellitus* and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes *mellitus* provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med.* 1998;15(7):539–53.
35. Gavin JR, Alberti KGMM, Davidson MB, DeFronzo R a, Drash a, Gabbe SG, et al. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes *Mellitus*. *Diabetes Care* [Internet]. 1997;20(7):1183–97. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8722072>
36. Group NDD. Classification and Diagnosis of Diabetes *Mellitus* and Other Categories of Glucose Intolerance. *Diabetes* [Internet]. 1995;28(12):1039–57. Disponible en: <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/28/12/1039%5Cn>
37. Conget I. Diagnóstico, clasificación y patogenia de la diabetes *mellitus*. *Rev Española Cardiol* [Internet]. 2002;55(5):528–35. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300893202766463>
38. McCulloch DK, Robertson PR. Pathogenesis of type 2 diabetes *mellitus*. 2014;36:197–209.
39. Suresh Lal B. Public health environment and social issues in india. Chapter 5: Diabetes: causes, symptoms and treatments. Serials Publications Pvt. Ltd.; 2016. p. 352.
40. American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in Diabetesd2018. *Diabetes Care.* 2018;41(January):S13–27.
41. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes - 2007. *Diabetes Care.* 2007;30(SUPPL. 1).
42. OPS. Guías ALAD. Guías ALAD diagnóstico, Control y Trat la Diabetes Mellit Tipo 2. 2006;1–80.
43. Alonso M, De Santiago A, Moreno A, Carramiñana F, Lopez F MS y colaboradores. Diabetes *mellitus*. Guías Clínicas. 2015;2–47. Disponible en: http://2016.jornadasdiabetes.com/docs/Guia_Diabetes_Semergen.pdf
44. Mediavilla Bravo JJ. Complicaciones de la diabetes *mellitus*. Diagnóstico y tratamiento. *Semergen* [Internet]. 2001;(27):132–45. Disponible en:

- <http://www.elsevier.es/es-revista-medicina-familia-semergen-40-articulo-complicaciones-diabetes-mellitus-diagnostico-tratamiento-S1138359301739317?redirectNew=true>
45. Alfaro J, Simal A BF. Tratamiento de la diabetes. Inf Ter Sist Nac Salud [Internet]. 2000;24:33–43. Disponible en: <http://www.msssi.gob.es/biblioPublic/publicaciones/docs/mellitus.pdf>
 46. Rodríguez Rivera NS, Cuautle Rodríguez P, Molina Guarneros JA. Hipoglucemiantes orales para el tratamiento de diabetes *mellitus* tipo 2: uso y regulación en México. Rev Hosp Juárez [Internet]. 2017;84(4):203–211. Disponible en: <http://www.msssi.gob.es/biblioPublic/publicaciones/docs/mellitus.pdf>
 47. Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. UNDECIMA. Mc. Interamericana Graw Hill, editor. Vol. XXXIII, Mexico; 2007. 1-2045 p.
 48. Del Pilar M, Sansone S, María Del Pilar D. Actualización en medicamentos antidiabéticos y riesgo cardiovascular. Rev Uruguay Cardiol [Internet]. 2016;(8):522–46
 49. Reyes Sanamé FA, Pérez Álvarez ML, Alfonso Figueredo E, Ramírez Estupiñán M, Jiménez Rizo Y. Tratamiento actual de la diabetes *mellitus* tipo 2. Correo Científico Médico [Internet]. 2016;20(1):98–121. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1560-43812016000100009
 50. Kuzmanic V. A. Insulinotherapy. REV MED CLIN CONDES. 2009;605–13.
 51. Rodríguez Lay G. Insulinoterapia. Rev Médica Hered [Internet]. 2003;14(3):140–4. Disponible en: <http://www.upch.edu.pe/famed/revista/index.php/RMH/article/view/564/615>
 52. DRUGBANK[Internet] Streptozotocin-Pharmacology [Fecha de acceso 30 de julio de 2018]. URL disponible en: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00428>.
 53. King AJF. The use of animal models in diabetes research. Br J Pharmacol. 2012;166(3):877–94.

54. Pathak S, Dorfmueller HC, Borodkin VS, van Aalten DMF. Chemical Dissection of the Link between Streptozotocin, O-GlcNAc, and Pancreatic Cell Death. *Chemistry & Biology*. 2008;15(8):799-807.
55. Vásquez Cotrina JJ. Efecto hipoglicemiante del extracto acuoso del *Ocimum sanctum* “albahaca morada” comparado con la metformina en *Rattus rattus var albinus*. 2016.
56. Taris Llumiguano LF. “Evaluación del efecto hipoglicemiante del extracto de hojas de chapuca o uvilla silvestre (*Physalis peruviana*) en ratas (*Rattus norvegicus*) con hiperglicemia inducida”. 2014;
57. Nuñez C. Extracción con Equipo Soxhlet. *Bioquímica y Biol Mol*. 2008;2(3):5.
58. Luque de Castro MD, García-Ayuso LE. Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future. *Anal Chim Acta*. 1998;369(1–2):1–10.
59. Gutierrez Zegarra ME. “Efecto del extracto acuoso del geranium *dielsianum knuth* (PASUCHACA) en la hiperglucemia inducida experimentalmente con estreptozotocina, en *Rattus Norvegicus*, Arequipa 2016.” 2016;
60. Flores Morales V, Castañeda Hernandez O, Montiel Santillan T, Hernandez Delgadillo GP. Análisis fitoquímico preliminar del extracto hexánico de hojas de *Hemiphyllacus novogalicianus*, una especie endémica de México. *Ing tejidos Una nueva Discip en Med Regen*. 2012;64:61–9.
61. Apaza Condori JE, Velasquez Rozas AL. “Validación de una técnica analítica por cromatografía en capa fina para la identificación de metabolitos de alprazolam, diazepam y clonazepam en muestras de orina en pacientes adultos del hospital dos de mayo en el año 2017”. 2018; Disponible en: [http://repositorio.uigv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.11818/2177/Tesis VELASQUEZ ROZAS- APAZA CONDORI.pdf?sequence=3&isAllowed=y](http://repositorio.uigv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.11818/2177/Tesis%20VELASQUEZ%20ROZAS-APAZA%20CONDORI.pdf?sequence=3&isAllowed=y)
62. Advantages of Thin Layer Chromatography | Science of Chromatography [Internet]. [cited 2018 Aug 1]. Available from: <http://chromatographyscience.blogspot.com/2012/10/advantages-of-thin-layer-chromatography.html#.W2E9xChKjIU>

63. Francisco F, Quintero N. Estandarización del método de cromatografía en capa fina para su aplicación en las ciencias forenses / F.F. Navarro Quintero. 2016;(April).
64. UNAM. Cromatografía en placa fina. 2015;3.
65. Morales R, Romero M. Estudio fotoquímico preliminar del fruto de la especie vegetal *Cyphomandra betacea* (tomate de palo) e identificación de alcaloides esteroideos. 2009;1-115. Disponible en: <http://ri.ues.edu.sv/2821/1/16100669.pdf>
66. Unam. Técnicas Cromatográficas. Quim Anal Instrum II. 2007;1-123.
67. Wagner H., Blatt S. "PLANT DRUG ANALYSIS-A Thin Layer Chromatography Atlas" 2nd ed. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. 2001;1-369.
68. Valencia EF, Donald D Mac, Cuyos M, Dueñas R. Extracción , identificación y evaluación de saponinas en *Agaricus bisporus*. 2005;31-6.
69. Zafar M, Naeem-Ul-Hassan Naqvi S. Effects of STZ-Induced Diabetes on the Relative Weights of Kidney, Liver and Pancreas in Albino Rats: A Comparative Study. Int J Morphol [Internet]. 2010;28(1):135-42. Disponible en: <http://www.scielo.cl/pdf/ijmorphol/v28n1/art19.pdf>
70. Carpenter J. "Formulario de Animales Exóticos". 3^{ra} ed. Argentina: Intermedica. 2006.
71. Cadenillas Garcia RE. "determinacion comparativa de los niveles de glucosa sanguinea en caninos adultos (*Canis lupus familiaris*) mediante glucometro digital de uso humano y metodo de laboratorio convencional en la ciudad de Cajamarca." Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0864-03942010000400001&script=sci_arttext
72. Performa | Accu-Chek [Internet]. [cited 2018 Aug 25]. Disponible en: <https://www.accu-chek.com.ar/medidores/performa>
73. Figueroa Valverde L, Díaz Cedillo F, Camacho Luis A, López Ramos M. "Determinación de la dosis adecuada de los aceites esenciales de *cinnamomumzeylanicum* (canela) sobre la hiperglicemia en *rattusnorvegicus* con diabetes *mellitus* tipo 2 inducida." 2015; Disponible en:

<http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/3196/NUayhukv.pdf?squence=1>

74. European Union. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Off J Eur Union. 2010;33–79.
75. Amador Garcia OK. Estudio bromatológico de hojas de *Moringa oleifera* in vitro y ex vitro y análisis del efecto hipoglucemiante en ratas Wistar diabetizadas. 2016;
76. Zuloeta Guerrero DA, Mejía Vásquez A. Efecto hipoglucemiante del consumo de yacón (*Smallanthus sonchifolius*) en ratones diabéticos tipo 2 inducidos con aloxano. Universidad Peruana Unión. 2015;76.
77. Soni K, Goswami A. identification , isolation and estimation of flavonoids and effect of growth regulators and salts on flavonoids in *Aegle marmelos* and *Moringa oleifera* in vitro. 2015;6(1):121–5.
78. Devaraj VC, Krishna BG, Viswanatha GL. Simultaneous determination of quercetin , rutin and kaempferol in the leaf extracts of *Moringa oleifera* Lam. and *Raphinus sativus* Linn. by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Chinese Integr Med. 2011;9(September 2011).}
79. Mamani B, Clara V, Palomino Q, Milagros E. “Efecto Hipoglicemiante de la Asociación *Smallanthus sonchifolius* “yacón” y *Geranium dielsianum* “pasuchaca” en ratas con diabetes inducida experimentalmente”. Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico. Arequipa. 2009.
80. Figueroa-Valverde L, Díaz-Cedillo F, Camacho-Luis A, López Ramos M. Efectos inducidos por *Ruta graveolens* L., *Cnidioscolus chayamansa* McVaugh y *Citrus aurantium* L. sobre los niveles de glucosa, colesterol y triacilglicéridos en un modelo de rata diabética. Brazilian J Pharmacogn. 2009;19(4):898–907.
81. Hafiz Muhammad I, Mohd Zaini A, Nurzalina Abdul KK, Amirin Sadikun. Effect of Ethanolic Extract of *Moringa oleifera* Lam. Leaves on Body Weight and Hyperglycemia of Diabetic Rats. Pakistan J Nutr [Internet]. 2016;15(2):112–7. Disponible en: <http://www.scialert.net/abstract/?doi=pjn.2016.112.117>

82. Edoga CO, Njoku OO, Amadi EN, Okeke JJ. Blood Sugar Lowering Effect of *Moringa Oleifera* Lam in Albino Rats. *Int J Sci Technol*. 2013;3(1):88–90.
83. Gupta R, Mathur M, Bajaj VK, Katariya P, Yadav S, Kamal R, et al. Evaluation of antid iabetic and antioxidant activity of *Moringa oleifera* in experimental diabetes. *J Diabetes*. 2012;4(2):164–71.
84. Zuo W, Yan F, Zhang B, Li J, Mei D. Advances in the Studies of Ginkgo Biloba Leaves Extract on Aging-Related Diseases. 2017;8(6):812–26.
85. Leiva Idígoras R. Páncreas. Cuidados en la Diabetes *Mellitus*. Bol estadístico salud. 2012;
86. Streptozotocin | C₈H₁₅N₃O₇ - PubChem [Internet]. [cited 2018 Aug 30]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5300#section=Pharmacology-and-Biochemistry>
87. Villar del Fresno, AM. “Farmacognosia Genereal”. 1a ed. :Editorial Síntesis, S.A. 1999. 336p

ANEXOS

ANEXO N° 01

IDENTIFICACIÓN Y TIPIFICACIÓN DEL ESPÉCIMEN VEGETAL



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA



CONSTANCIA 10- 2018-HUSA

El Director del *Herbarium Arequipense* (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

HACE CONSTAR:

Que las muestras frescas de la planta traída al laboratorio para el análisis botánico corresponde a la especie *Moringa oleifera* Lam de la familia Moringaceae de nombre común "Marango". Dichas muestras fueron obtenidas de zonas de cultivo del distrito del Pedregal, provincia de Caylloma, departamento Arequipa por IDANIA ESTEPHANY CHOQUE LLERENA y CRISTEL PATRICIA CAMARGO ANAHUA, para la ejecución de la Tesis: EVALUACION DEL EFECTO HIPOGLUCEMIANTE DEL EXTRACTO ETANOLICO DE *Moringa oleifera* "Moringa" EN ANIMALES DE EXPERIMENTACION. AREQUIPA, 2018, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Católica de Santa María.

Los resultados de dicha identificación y tipificación corresponde según APG IV :

DIVISION : Angiospermae
Clado: Eudicots
Clado: Rosids
ORDEN: Brassicales
FAMILIA: Moringaceae
GENERO: Moringa
ESPECIE: *Moringa oleifera* Lam.

Se expide la presente constancia a solicitud del interesado para los fines que se estime por conveniente.

Arequipa 18 de Abril del 2018



Blgo. Leoncio Mariño Herrera
DIRECTOR

ANEXO N° 02

RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS DE *Moringa oleífera* Lam
“MORINGA”

Extracciones por triplicado	Peso del Extracto Etanólico blando (g)	Peso del Extracto de Acetato de Etilo blando (g)	Peso del Extracto de Éter Etílico blando (g)
1	3.38	0.98	1.99
2	3.41	1.20	2.01
3	3.36	1.00	2.02
Promedio	3.38	1.06	2.00

ANEXO N° 03

CALCULOS PARA LA DOSIFICACION DE LOS TRATAMIENTOS

Dosificación de STZ (45 mg/Kg)

$$\begin{aligned}
 45 \text{ mg} & \text{-----Kg} & 20 \text{ mg} & \text{-----} 1\text{ml} \\
 X & \text{-----} 0.386\text{Kg} & 17.37 \text{ mg} & \text{-----} Y \\
 X & = 17.37 \text{ mg de STZ} & Y & = 0.87 \text{ ml}
 \end{aligned}$$

Dosificación de tratamientos: Considerando el 20% de agua presente en el extracto blando

➤ Grupo extracto 500 mg/Kg

$$\begin{aligned}
 500 \text{ mg} & \text{-----Kg} & 70 \text{ mg} & \text{-----} 1\text{ml} \\
 X & \text{-----} 0.342 \text{ Kg} & 171 \text{ mg} & \text{-----} Y \\
 X & = 171 \text{ mg de extracto} & Y & = 2.44 \text{ ml}
 \end{aligned}$$

➤ Grupo extracto 350 mg/Kg

$$\begin{aligned}
 350 \text{ mg} & \text{-----Kg} & 70 \text{ mg} & \text{-----} 1\text{ml} \\
 X & \text{-----} 0.364 \text{ Kg} & 127.4 \text{ mg} & \text{-----} Y \\
 X & = 127.4 \text{ mg de extracto} & Y & = 1.82 \text{ ml}
 \end{aligned}$$

➤ Grupo Metformina 350 mg/Kg

$$\begin{aligned}
 350 \text{ mg} & \text{-----Kg} & 70 \text{ mg} & \text{-----} 1\text{ml} \\
 X & \text{-----} 0.346 \text{ Kg} & 121.1 \text{ mg} & \text{-----} Y \\
 X & = 121.1 \text{ mg de Metformina} & Y & = 1.73 \text{ ml}
 \end{aligned}$$

ANEXO N° 04
EFFECTO HIPOGLICEMIANTE DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE
Moringa oleífera Lam (MORINGA) (500 mg/Kg)

GRUPO DE EXTRACTO ETANÓLICO 500mg/Kg									
N°	RATAS	CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA (mg/dL)							
		INICIAL	POST STZ (DÍA 0)	TRATAMIENTO					
				DÍA 5	DÍA 10	DÍA 15	DÍA 20	DÍA 25	DÍA 30
1	CBZ	51	419	385	338	255	194	146	98
2	DORSO	71	422	386	364	271	201	159	101
3	COLA	69	443	360	331	246	199	155	100
4	PATA ANT DER	53	381	336	301	221	153	121	92
5	PATA POST DER	69	424	396	356	299	217	174	107
PROMEDIO		62	419	372	340	258	192	151	99

ANEXO N° 05

EFFECTO HIPOGLICEMIANTE DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE
Moringa oleífera Lam (MORINGA) (350 mg/Kg)

GRUPO DE EXTRACTO ETANÓLICO 350mg/Kg									
N°	RATAS	CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA (mg/dL)							
		INICIAL	POST STZ (DÍA 0)	TRATAMIENTO					
				DÍA 5	DÍA 10	DÍA 15	DÍA 20	DÍA 25	DÍA 30
1	CABZ- DORSO- COLA	68	386	352	321	268	241	158	110
2	CBZ-PAT ANT DER	72	482	441	395	326	247	168	122
3	CBZ- PATPOST DER	52	447	402	364	310	232	162	121
4	CBZ-PAT ANT IZQ	65	394	373	302	274	245	159	120
5	CBZ-PAT POST IZQ	68	464	434	401	352	289	165	128
PROMEDIO		65	434	400	356	306	250	162	120

ANEXO N° 06

EFECTO HIPOGLICEMIANTE EN EL GRUPO METFORMINA (850mg)

GRUPO DE METFORMINA 350mg/Kg									
N°	RATAS	CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA (mg/dL)							
		INICIAL	POST STZ (DIA 0)	TRATAMIENTO					
				DÍA 5	DÍA 10	DÍA 15	DÍA 20	DÍA 25	DÍA 30
1	CBZ-4 PATAS	61	422	251	189	152	117	84	63
2	CBZ- DORSO	60	395	242	182	149	115	79	59
3	CBZ-PATA ANTRS	54	424	211	162	151	120	95	81
4	CBZ-PATA POSTRS	65	339	203	154	134	113	94	72
5	CBZ-PATA CRUZD	63	388	244	171	148	118	97	65
PROMEDIO		60	393	230	171	146	116	89	68

ANEXO N° 07

EFECTO HIPOGLICEMIANTE EN EL GRUPO STZ (AGUA DESTILADA)

GRUPO DE CONTROL POSITIVO									
N°	RATAS	CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA (mg/dL)							
		INICIA L	POST STZ (DÍA 0)	TRATAMIENTO					
				DÍA 5	DÍA 10	DÍA 15	DÍA 20	DÍA 25	DÍA 30
1	PATA ANT IZQUIERDA	68	399	403	404	407	415	419	425
2	PATA POST IZQUIERDA	71	412	416	418	421	423		
3	PATA LAT DERECHA	70	421	421	423	425	430		
4	PATA LAT IZQUIERDA	69	361	381	386	391	397	398	406
5	PATAS ANTERIOR	69	408	412	416	417	419	421	428
	PROMEDIO	69	400	406	409	412	416	412	419

ANEXO N° 08

EFECTO DE LA DIETA EN LOS NIVELES DE GLUCOSA

GRUPO BLANCO									
N°	RATAS	CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA (mg/dL)							
		INICIAL	DÍA 0	TRATAMIENTO					
				DÍA 5	DÍA 10	DÍA 15	DÍA 20	DÍA 25	DÍA 30
1	CBZ-PAT LAD DERE	74	76	78	78	81	82	82	84
2	CBZ-PAT LAD IZQ	65	65	67	69	68	69	70	73
3	DORSO- COLA	63	69	72	73	74	76	77	79
4	CBZ PAT ANTRES	59	60	64	66	69	70	72	74
5	PATAS POSTRS	56	58	60	62	64	65	66	68
PROMEDIO		63	65	68	69	71	72	73	75

ANEXO N° 09

PRIMEROS SÍNTOMAS PRESENTADOS POR LOS ANIMALES, DESPUES DE LA APLICACIÓN DE STZ



Fig. 1: Poliuria
(aumento de la
frecuencia urinaria)



Fig.2. Polidipsia (sed
exagerada).



FIGURA 3. Polifagia
(aumento del apetito)



FIGURA 4. Disminución de
peso.

ANEXO N°10

CONSTANCIA DE CORTES HISTOLÓGICOS Y LECTURA



UNSA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN DE AREQUIPA



FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO ACADÉMICO
DE MICROBIOLOGÍA Y PATOLOGÍA

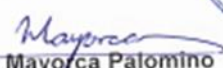
CONSTANCIA

El que suscribe, Director del Departamento de Microbiología y Patología de la Facultad de Medicina de la UNSA, deja constancia que en el Laboratorio de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la UNSA, se realizaron los cortes histológicos (10 láminas) y la lectura respectiva, desde el 22 de junio hasta el 10 de julio del 2018; para la tesis titulada **"Evaluación del efecto Hipoglicemiante del extracto de hojas de Moringa oleífera Lam en animales de experimentación. Arequipa 2018"** cuyos autores son: Cristel Patricia Camargo Anahua e Idania Estephany Choque Llerena, para optar el título profesional de Químico Farmacéutico de la Escuela de la Farmacia y Bioquímica de la UCSM.

Se extiende la presente constancia a solicitud de las interesadas para los fines consiguientes.

Arequipa 2018 julio 11


Méd. Claudia Mares Cuadros
Docente de la Sección de
Patología


Dra. Blanca Mayorca Palomino
Directora del Departamento Académico
Microbiología y Patología



ANEXO N° 11
Tabla ANOVA para valores de Glucosa Basal

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	219.2	4	54.8	1.2	0.3232
Intra grupos	878.8	20	43.9		
Total (Corr.)	1098	24			

ANEXO N°12
Tabla ANOVA para valores de Glucosa post Estreptozotocina

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	483833	4	120958	147.0	0
Intra grupos	16447.2	20	822.3		
Total (Corr.)	500280	24			

ANEXO N° 13
Tabla ANOVA para valores de glucosa después de 5 días tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	426105	4	106526	188.3	0
Intra grupos	11313.2	20	565.6		
Total (Corr.)	437418	24			

ANEXO N° 14
Tabla ANOVA para valores de glucosa después de 10 días tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	406970	4	101743	169.3	0
Intra grupos	12012.8	20	600.6		
Total (Corr.)	418983	24			

ANEXO N° 15
Tabla ANOVA para valores de glucosa después de 15 días de tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	357606	4	89401.6	188.2	0
Intra grupos	9497.6	20	474.8		
Total (Corr.)	367104	24			

ANEXO N° 16
Tabla ANOVA para valores de glucosa después de 20 días de tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	361920	4	90480	358.1	0
Intra grupos	5052.8	20	252.6		
Total (Corr.)	366973	24			

Anexo N° 17

Tabla ANOVA para valores de glucosa después de 25 días de tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	262703	4	65675.9	516.26	0
Intra grupos	2289.8	18	127.2		
Total (Corr.)	264993	22			

Anexo N° 18

Tabla ANOVA para valores de glucosa después de 30 días de tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	298000	4	74499.9	1406.8	0
Intra grupos	953.2	18	52.9		
Total (Corr.)	298953	22			

Anexo N° 19

Tabla ANOVA para Área Bajo la Curva valores de glucosa a los 30 días de tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2.84E+08	4	7.10E+07	365.65	0
Intra grupos	3.88E+06	20	194247		
Total (Corr.)	2.88E+08	24			